

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

Estudio de la proteína cortactina en la adhesión celular y de la familia de proteínas adaptadoras CrK en la formación del pedestal de actina por "Escherichia coli" enteropatógena

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Eugenia Meiler Rodríguez

Directora

Narcisa Martínez Quiles

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**Estudio de la proteína cortactina en la adhesión celular y de la familia de
proteínas adaptadoras Crk en la formación del pedestal de actina por
Escherichia coli enteropatógena**

*Study of cortactin protein in cell adhesion and the family of Crk adaptor proteins
in actin pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli*

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor

Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor

MARÍA EUGENIA MEILER RODRÍGUEZ

Directora (*Supervisor*)

NARCISA MARTÍNEZ QUILES

Madrid, 2015

**D.ª CONCEPCIÓN GIL GARCÍA, Directora del Departamento de Microbiología II de la
Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid**

CERTIFICA: Que D.ª **MARÍA EUGENIA MEILER RODRÍGUEZ** ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la doctora **NARCISA MARTÍNEZ QUILES**, la Parte I del trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

“Estudio de la proteína cortactina en la adhesión celular y de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación del pedestal de actina por *Escherichia coli* enteropatógena.”

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2015

Fdo. Catedrática D.ª Concepción Gil García

D. JOSÉ RAMÓN REGUEIRO GONZÁLEZ-BARROS, Director del Departamento de Microbiología I (Área de Inmunología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que D.^a **MARÍA EUGENIA MEILER RODRÍGUEZ** ha realizado en el Departamento de Microbiología I (Área de Inmunología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la doctora **NARCISA MARTÍNEZ QUILES**, la Parte II del trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

“Estudio de la proteína cortactina en la adhesión celular y de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación del pedestal de actina por *Escherichia coli* enteropatógena.”

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2015

Fdo. Catedrático D. José Ramón Regueiro González-Barros

D.^a NARCISA MARTÍNEZ QUILES, miembro del Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia (cursos académicos 2004-2011) y actualmente profesora del Departamento de Microbiología I (Área de Inmunología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que D.^a **MARÍA EUGENIA MEILER RODRÍGUEZ** ha realizado bajo mi dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

“Estudio de la proteína cortactina en la adhesión celular y de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación del pedestal de actina por *Escherichia coli* enteropatógena.”

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2015

Fdo. Dra. Narcisa Martínez Quiles

Este trabajo ha sido financiado por:

- Proyecto del Instituto de Salud "Carlos III". Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). PI06-0004, co-financiado con Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).
- Proyecto del Instituto de Salud "Carlos III". Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). PS09/00080, co-financiado con Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).

La doctoranda ha sido financiada por:

- Proyecto Fundación Médica Mutua Madrileña (FMMM-01754/2008) desde el 01/01/2009 al 14/01/2010.
- Beca de Formación de Personal Investigador de la Universidad Complutense de Madrid (UCM-FPI) desde el 15/01/2010 al 31/10/2010.
- Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU, AP2009-1529) del Ministerio de Educación desde el 01/11/2010 al 14/01/2014.
- Beca de la *Federation of European Biochemical Societies* (FEBS) para la realización de la estancia corta desde el 01/07/2013 al 30/09/2013.

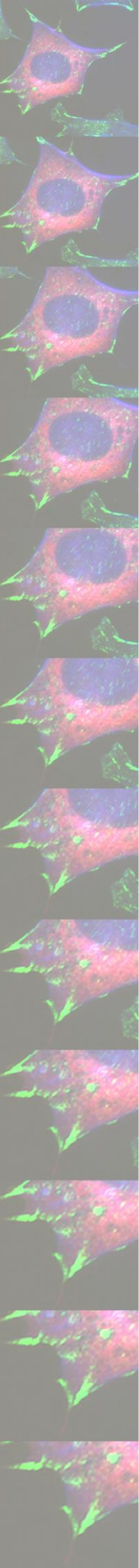
"A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales."

Marie Curie

A mis padres

A mi abuela

AGRADECIMIENTOS



Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Narcisa Martínez Quiles, por haberme dado la oportunidad de formar parte de tu grupo. Gracias por todo lo que me has enseñado y por tu dedicación en los proyectos en los que he participado, ya que en gran parte debido a tu implicación y esfuerzo hemos conseguido que esta etapa haya sido muy productiva. Gracias también por el tiempo dedicado en encontrar un laboratorio para realizar la estancia breve.

Me gustaría agradecer a la Fundación Médica Mutua Madrileña, a la Universidad Complutense de Madrid, al Ministerio de Educación y a la FEBS la financiación recibida durante estos años de doctorado, la cual ha hecho posible la realización de la presente tesis doctoral.

Gracias también al resto de personas que han formado parte del grupo: a Preeti, a Lidia, a Reda, también a Lysseth por sus "situaciones" que nos amenizaban los días, a María Benito por su ayuda para la finalización del último trabajo del grupo en el que he participado y muy en especial, a Elvira Nieto Pelegrín por haber sido casi como una hermana mayor en lo profesional y en lo personal, por todo lo que me has enseñado, por tu amistad, por tu apoyo, por tu generosidad y por estar para mí siempre que lo necesito.

Además, quiero dar las gracias a todos los investigadores que nos han cedido generosamente construcciones, líneas celulares, anticuerpos, etc., los cuales han sido fundamentales para efectuar muchos de los experimentos presentados en este trabajo. Gracias al Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América), Dr. Edward Seto (Cancer Center and Research Institute, Estados Unidos de América), Dr. Brendan Kenny (University of Newcastle, Reino Unido), Dr. Brett B. Finlay (University of British Columbia, Canadá), Dr. Gonzalo Rivera (Texas A&M University, Texas, Estados Unidos de América), Dr. Michiyuki Matsuda (Osaka University, Japón), Dr. Scott B. Snapper (Massachusetts General Hospital, Estados Unidos de América), Dr. Tony Pawson (Mount Sinai Hospital, Canadá), Dr. Thomas Curran (The Children's Hospital of Philadelphia, Estados Unidos de América), Dr. Akira Imamoto (The University of Chicago, USA), Dr. Tso-Pang Yao (Duke University, Estados Unidos de América), Dr. Leandro Sastre y a la Dr. Susana Alemany (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", y Universidad Autónoma de Madrid).

Asimismo estoy muy agradecida con los dos departamentos en los que he desarrollado la presente tesis doctoral. Gracias al departamento de Microbiología II por el ambiente científico, constructivo y entrañable que se respira en el departamento. En especial quiero agradecer a María Molina y a Concha Gil por vuestra extraordinaria labor como directoras del departamento y por vuestro apoyo profesional. También quiero agradecer a Noelia Blanco por ser una gran amiga además de compañera de trabajo, por compartir cada día nuestras aventuras y desventuras durante casi 5 años. Gracias a Nacho por tu apoyo y amistad. Gracias a los compañeros de la U5: Pablo, Andrea, Nadia y Conchita Pintado. Gracias también a Almudena, Teresa, Leti, Esme, José Antonio, Ana, Aida, Belén y demás compañeros del departamento de Microbiología II, por los buenos ratos dentro y fuera del laboratorio. También gracias a Benito y José Alberto por vuestra buena disposición a ayudarnos en lo que hiciera falta y por vuestra simpatía. Gracias a todos los becarios y profesores que formáis parte de esta gran familia.

Gracias también a todos los componentes del departamento de Microbiología I Sección de Inmunología por la estupenda acogida. Gracias por todos esos seminarios, en los que he aprendido mucho con vuestros comentarios constructivos. En especial, gracias a José Ramón Regueiro por su excelente labor como director del departamento, así como por su apoyo profesional. Gracias a Manolo Martín Villa por acogernos en su laboratorio y por su apoyo para hacer posible la publicación de nuestro último trabajo. También quiero agradecer a Bea y Miguel por su ayuda en lo referente al funcionamiento general del departamento. Gracias a Patri, porque fue genial compartir el laboratorio contigo y por tu apoyo después de haberme ido. También gracias a Laura y a Javi por ser tan buenos compañeros de laboratorio.

Gracias a Gonzalo Rivera por su tiempo y apoyo en la solicitud de la beca FPU para la realización de la estancia breve en su laboratorio.

I feel very grateful to Christoph Ballestrem, thank you for giving me the chance to be part of your team for 3 months and also for being such an enthusiastic supervisor and a wonderful person. Thanks a lot to everyone in the Christoph's lab because thanks to all of you my short term visit was an excellent experience. Thanks to Alicja, Eleonora and especially to Paul for teaching me everything I needed to know to work in the lab and last but not least, thank to Adam for your support and advice.



Muchas gracias a mis actuales jefes de GSK, Alfonso Mendoza y Esther Pérez, por haberme dado la oportunidad de formar parte de vuestro equipo, por vuestra excelente calidad profesional y humana, así como por vuestra comprensión durante esta etapa. Gracias también a todos mis compañeros de trabajo de GSK y en especial a María, Pedro, Rubén, Eva, Flavia, María José, Delia y Santi por vuestro apoyo para finalizar esta etapa. Asimismo gracias a Dani, a Lolo y a Sara por los buenos ratos y por vuestra ayuda en el comienzo. Gracias también a Noe, a Carol y a Ángel por vuestros ánimos para concluir esta etapa. Gracias a todos por el genial ambiente de trabajo que creáis y por todo lo que me habéis enseñado en estos meses.

En lo personal quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional que me habéis dado durante toda mi vida y sobre todo en los últimos años. Gracias a mis hermanas por el vínculo especial que nos ha unido siempre. A mi pequeño hermanito por tu sabiduría que te llevará lejos y por ser mi compañero de biblioteca en los últimos días de escritura. En especial quiero agradecer a mis padres, por creer en mis sueños y por ayudarme a hacerlos realidad; gracias también por enseñarme a no rendirme ante nada y perseguir mis metas con esfuerzo e ilusión. Sin vuestro apoyo esto no habría sido posible. Gracias a mi abuela por su cariño y por haber sido un gran ejemplo de saber estar, de templanza y entereza. Gracias a mi madrina por los ánimos y fuerza que siempre me da para seguir adelante. Gracias también a mis cuñados Alberto y David por el apoyo y consejos que me habéis dado en esta etapa.

Gracias a David Mentado por haberme apoyado desde el principio en este proyecto, por creer en mí y por haber estado siempre que te he necesitado durante este largo viaje. Gracias a Araceli Serrano por todo tu apoyo, por estar siempre dispuesta a escucharme y a darme un abrazo cuando lo he necesitado. A Laura Tejada por haberte convertido en una de mis personas favoritas y por todo lo que me has apoyado en los últimos años. A Angelique, gracias por tu amistad, por tu paciencia y por recordarme que hay vida, además de tesis.

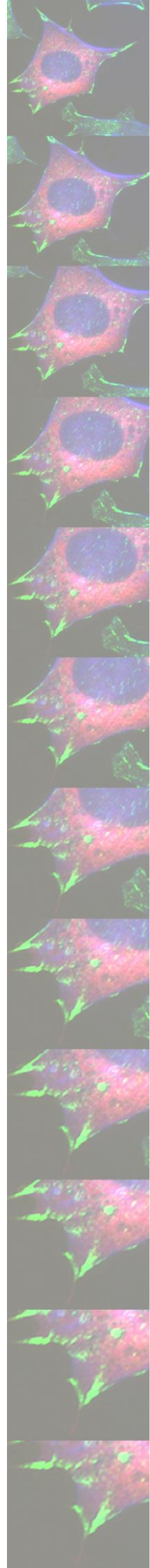
A Mario y Davinia, gracias por acogerme cuando llegué, por haber formado parte de mi familia canaria en Madrid y por prestarme a vuestros amigos: Sergio, Sandra, Hector, Jazmi, Jill y Edu. Gracias a todos por los buenos momentos que hemos compartido durante estos años.



A Indu y Katie gracias por vuestra amistad, por vuestro apoyo y por ayudarme a mejorar mi inglés. Gracias también a mis amigas de la Universidad de La Laguna: Idaira, Aaron, Auro, Nira, Elena, Zayda, Ariana, Vanesa y Leire por vuestro apoyo en esta etapa y por todos estos años de amistad que espero que dure para siempre.

Gracias también a Cris y a Juanjo por ser tan buena gente, por los buenos ratos y por vuestra ayuda siempre que la he necesitado. Gracias a las amistades como Clementine y Seb que siempre me aportan cosas nuevas. Por último, gracias a mis compis de piso de Carranza por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos en los últimos meses.

ÍNDICE

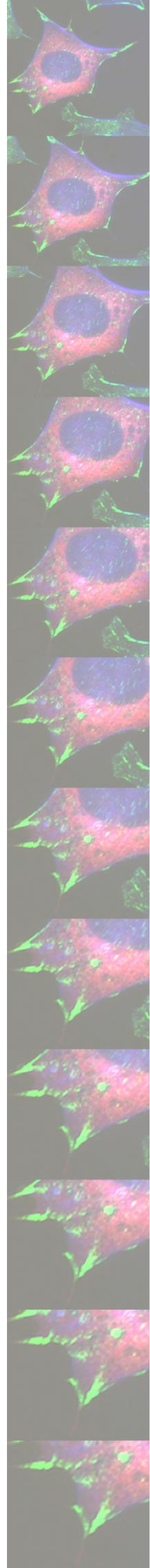


ÍNDICE

ÍNDICE.....	23
ABREVIATURAS.....	27
SUMMARY	31
RESUMEN.....	39
INTRODUCCIÓN	47
1. El citoesqueleto de actina	47
1.1 Polimerización de actina.....	47
1.2 Factores promotores de la nucleación	49
2. Cortactina.....	50
2.1 Estructura de cortactina	51
2.2 Regulación de cortactina por fosforilación/desfosforilación.....	53
2.2.1 El sistema <i>Functional Interaction Trap</i>	56
2.3 Regulación de cortactina por acetilación/deacetilación.....	58
3. Papel de cortactina en el <i>spreading</i> celular y en las adhesiones focales.....	60
3.1 <i>Spreading</i> celular.....	60
3.2 Adhesiones focales	62
4. Proteínas adaptadoras Crk.....	66
4.1 Estructura y función de la familia de las proteínas adaptadoras Crk.....	67
4.2 Regulación de las proteínas adaptadoras Crk.....	69
4.2.1 Regulación de las proteínas adaptadoras Crk por fosforilación.....	69
4.2.2. Otros mecanismos de regulación de las proteínas adaptadoras Crk.....	71
4.3 Papel de las proteínas adaptadoras Crk en la patogénesis bacteriana.....	71
5. Formación de pedestales de actina por EPEC.....	73
5.1 Factores de patogenicidad	74
5.1.1 Sistema de secreción de tipo III.....	75
5.1.2 Efectores LEE.....	76
5.2 Receptor translocado de intimina, Tir	77
5.3 Rutas de formación de pedestales de actina por EPEC.....	78
OBJECTIVES.....	83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
1. Cultivos celulares.....	87
2. Cultivos bacterianos.....	88
3. Preparación de bacterias competentes DH5α y BL21 por el método de Cloruro de Rubidio	89
4. Transformación por choque térmico	89
5. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	90
6. Construcciones.....	90
7. Transfecciones y procesamiento de las células.....	94
8. Tratamiento <i>siRNA</i>	95
9. Expresión de proteínas en <i>E. coli</i>	95
10. Ensayos <i>Pull down</i>	96
11. <i>Western-blot</i>	96
12. Inmunoprecipitación.....	99
13. Inmunofluorescencia indirecta y tinciones	101
14. Ensayos de <i>spreading</i> celular.....	103
15. Tratamientos.....	104
16. Infecciones con EPEC.....	105
17. Curva de fosforilación de CrkII y CrkL.....	106

18. Análisis estadístico	107
RESULTADOS	111
Parte I: Estudio de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina y su efecto en el <i>spreading</i> celular.....	111
1. Puesta a punto del sistema <i>Functional Interaction Trap</i>	111
1.1 El sistema <i>Functional Interaction Trap</i>	111
1.2 Análisis de la fosforilación de cortactina por la proteína tirosina quinasa Src	111
1.3 Controles del sistema FIT	114
2. Control de especificidad del sistema FIT	116
2.1 Análisis por <i>Western Blot</i> con un anticuerpo anti-fosfotirosina genérico.....	116
2.2 Control de especificidad de sustrato de la quinasa Src usando el sistema FIT.....	118
2.3 Especificidad de la fosforilación de cortactina mediante el sistema FIT.....	119
3. Análisis de la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina mediante el sistema FIT en células HeLa.....	120
3.1 Análisis de cortactina	120
3.2 Análisis de cortactina fosforilada en residuos de tirosina.....	124
3.3 Análisis de cortactina fosforilada en el residuo de tirosina 466.....	125
4. Análisis de la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina endógena en células WT y deficientes en HDAC6.....	127
5. Análisis de la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina endógena en células SYF y Rsrc.	129
6. Localización de cortactina fosforilada por la quinasa Src mediante el sistema FIT.....	131
7. Estudio del papel de cortactina durante el <i>spreading</i> celular	133
7.1 Análisis de la fosforilación de cortactina durante el <i>spreading</i> celular.....	133
7.2 Análisis de la acetilación de cortactina durante el <i>spreading</i> celular.....	136
7.3 Implicación de cortactina en las adhesiones focales.....	138
8. Análisis de la interacción de cortactina y la quinasa FAK durante el <i>spreading</i> celular.....	140
8.1 Papel de la fosforilación de cortactina en la interacción con la quinasa FAK.....	140
8.2 Implicación de la proteína N-WASP en el complejo cortactina-FAK.....	142
9. Análisis de las adhesiones focales.....	143
Parte II: Estudio del papel inhibitorio y redundante de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación de pedestales por EPEC.....	145
1. Localización de CrkII y del mutante CrkII R38V.....	145
2. Localización y análisis del efecto del dominio SH2 aislado de CrkII	147
3. Análisis del estatus de fosforilación de CrkII y CrkL durante la infección por EPEC	150
4. Localización de CrkII y CrkL fosforiladas tras la infección por EPEC.....	152
5. Inhibición de la expresión de CrkL mediante <i>siRNA</i>	157
6. Expresión del mutante CrkII R38V en células deficientes en CrkL.....	158
7. Análisis de los niveles de expresión de CrkII y CrkL	160
8. Análisis de la interacción del dominio SH2 de CrkII y CrkL con la proteína Tir	161
DISCUSIÓN.....	169
La fosforilación de cortactina en residuos de tirosina impide su acetilación e inhibe el <i>spreading</i> celular.....	169
Las isoformas de la familia Crk se localizan en los pedestales formados por EPEC, interaccionan con la proteína efectora Tir e impiden la localización de Nck en estas estructuras	178
CONCLUSIONES.....	189
REFERENCIAS	193
APÉNDICE.....	213

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

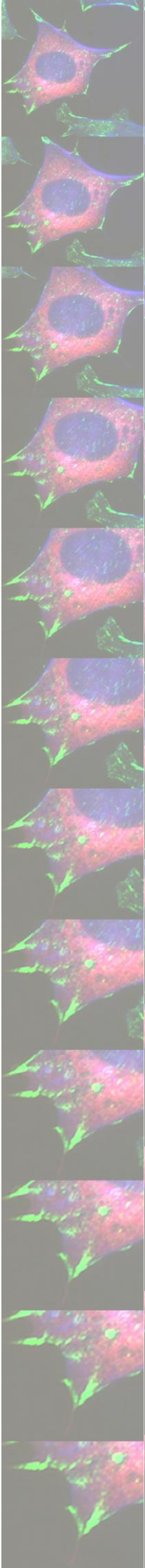
A/E: *Attaching and effacing*
Abl: *Abelson tyrosine kinase*
ABR: *Actin-Binding Region*
ACK1: *Activated Cdc42-associated Kinase 1*
AcMo: *Anticuerpo Monoclonal*
Actina-F: *filamentos de actina*
Actina-G: *monómeros de actina globular*
ADF: *Actin-Depolymerizing Factor*
ADP: *nucleótido de adenina difosfato*
Arg: *Abl-related gene*
Arp2/3: *Actin-related protein 2/3*
ARPC: *Actin-Related Protein Component*
ATAT1: *Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1)/MEC-17 (Mechanosensory-17)*
ATP: *nucleótido de adenina trifosfato*
Bcr: *Breakpoint cluster region*
BFP: *Bundle-Forming Pili*
BSA: *Bovine serum albumin*
CagA: *Cytotoxin-associated gene A*
CBP: *CREB (cAMP Response Element-Binding) Binding Protein*
Cdc42: *Cell division cycle 42*
CML: *Chronic myeloid leukaemia*
cortactina Y421,466,482F (3F): *mutante de cortactina no fosforilable por la proteína tirosina quinasa Src*
CR: *Citrobacter rodentium*
Crk: *CT10 (chicken tumour virus no. 10) regulator of kinase*
Crkl/II-/-: *fibroblastos embrionarios derivados de ratones knockout de Crkl/II*
CrkL-/-: *fibroblastos embrionarios derivados de ratones knockout de CrkL*
CrkL: *Crk-Like*
c-Src, Src: *cellular Sarcoma tyrosine kinase*
C-terminal: *carboxilo terminal*
CTTN: *Cortactin*
DDW: *Ácido aspártico-Ácido Aspártico-Triptófano*
DMSO: *Dimetilsulfóxido*
D.O.: *Densidad Óptica*
E: *Ácido glutámico*
EAF: *EPEC Adherence Factor*

ECM: *Extracellular Matrix*
EDTA: *Ácido etildiaminotetraacético*
EGF: *Epidermal Growth Factor*
EHEC: *Enterohemorrhagic Escherichia coli*
EPEC: *Enteropathogenic Escherichia coli*
Erk: *Extracellular-signal-regulated protein kinase*
Esp: *EPEC secreted protein*
Etk: *Epithelial and endothelial tyrosine kinase*
FAK: *Focal Adhesion Kinase*
FAT: *Focal Adhesion Targeting*
FBS: *Fetal Bovine Serum*
Fer: *Feline sarcoma-related*
FERM: *4.1 protein, Ezrin, Radixin, Moesin domain*
FGF: *Fibroblast Growth Factor*
Fgr: *Feline gardner-rasheed sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog*
FH: *Formin Homology*
Fig(s): *Figura(s)*
FIT: *Functional Interaction Trap*
FL: *Full-length*
FN: *Fibronectina*
Fyn: *FYN oncogene related to SRC, FGR, YES*
Gab1: *Grb2-associated binder-1*
GBD: *GTPase-Binding Domain*
Gcn5: *General control non-derepressible 5*
GEFs: *Guanine Nucleotide Exchange Factors*
GFP: *Green fluorescent protein*
GNAT: *Gcn5-related N-acetyltransferase*
GST: *Glutathione S-transferase*
GTPasas: *Trifosfatasa de Guanosina*
HATs: *Histona acetiltransferasas*
Hck: *Hemopoietic cell kinase*
HDAC6: *histona deacetilasa 6*
HDACs: *Histonas deacetilasas*
HeLa: *células epiteliales derivadas de cáncer cérvico-uterino humano*
HS1: *Hematopoietic Specific 1*
IBD: *Intimin-Binding Domain*
IFI(s): *Inmunofluorescencia(s) Indirecta(s)*
IMDM: *Iscoe's Modified Dulbecco's Media*
IP(s): *Inmunoprecipitación*
IPTG: *isopropil β-D-tiogalactosido*

JMY: *Junction-Mediating and –regulatory protein*
kDa: kiloDalton
LB: Luria Bertani
LEE: *Locus of Enterocyte Effacement*
Map: *Mitochondrial-associated protein*
MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*
MOI: *Multiplicity of infection*
NACC1: *Nucleus Accumbens-Associated 1*
Nck/-: fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Nck1/2*
Nck: *Non-catalytic tyrosine kinase*
NPFs: *Nucleation Promoting Factors*
NPY: *Asparagina-Prolina-Tirosina*
NTA: *Amino-Terminal Acidic*
N-terminal: Amino terminal
N-WASP/-: fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *N-WASP*
N-WASP: *Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*
p130Cas: *p130 Crk-associated substrate*
p300: proteínas de 300 kDa
Pak1: *p21 activated kinase 1*
PBS: *Phosphate buffered saline*
PCAF: *p300/CBP-Associated Factor*
PD: *Pull Down*
PDZ: *Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disk large tumor suppressor (DlgA), and Zonula occludens-1 protein (zo-1)*
PIP₂: *Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*
PKA: *Protein Kinase A*
PKD: *Protein kinase D*
PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*
PNAY: *Prolina-Asparagina-Alanina-Tirosina*
PP2: *4-Amino-3-(4-clorofenil)-1-(t-butil)-1H-pirazol [3,4-d]pirimidina*
PRR(s): *Proline-Rich Region(s)*
ptir: plásmido pACYC184 de baja copia y contiene los genes *3' map, tir y cesT*
PTP1B: *Protein-Tyrosine Phosphatase 1B*
PV: *Pervanadato*
RapRTAP: *Rapamycin-Regulated Targeted Activation of Pathways*
REPEC: *Rabbit Enteropathogenic Escherichia coli*
RIAM: *RAP1–GTP-Interacting Adaptor Molecule*

Rsrc: *Fibroblastos embrionarios derivados de ratones knockout de Src, Yes y Fyn reconstituidos con c-Src*
RSV: *Rous sarcoma virus*
S: *Serina*
SCAR: *Suppressor of cAMP Receptor*
SD: *Standard Deviation*
SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*
SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SEM: *standard Error of the Mean*
SFKs: *Src Family of protein tyrosine Kinases*
SH2: *Src Homology 2*
SH3: *Src Homology 3*
siRNA: *Small interference RNA*
Sirt1: *Sirtuin 1*
STEAEC: *Shiga toxin-producing Enterotoaggregative Escherichia coli*
SYF: *Fibroblastos embrionarios derivados de ratones knockout de Src, Yes y Fyn*
Syk: *Spleen tyrosine kinase*
TepP: *Translocated early Phosphoprotein*
Tir: *Translocated intimin receptor*
TRITC: *Texas Red Isothiocyanate*
TSA: *Trichostatin A*
VCA: *Verprolin-homology, Cofilin-homology or Central, Acidic*
v-crK: *viral-CT10 (Chicken Tumor virus 10) Regulator of Kinase oncogene*
v-Src: *viral Sarcoma tyrosine kinase*
WASH: *WASP and Scar Homolog*
WASP: *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*
WAVE: *WASP family Verprolin-homologous protein*
WB: *Western Blot*
WH1: *WASP Homology 1*
WH2: *WASP Homology 2*
WHAMM: *WASP Homology associated with Actin, Membranes, and Microtubules*
WIP: *WASP-Interacting Protein*
WT: *Wild type*
Y: *Tirosina*
Yes: *v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1*

SUMMARY



SUMMARY

Study of cortactin protein in cell adhesion and the family of Crk adaptor proteins in actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli*

Introduction

The cell cytoskeleton is a dynamic network composed of actin filaments that is reassembled in different processes such as cell adhesion, migration or pathogenic infection.

Cortactin was initially characterised as a cortical protein and a Src kinase substrate. Cortactin is a modular protein that possesses an acidic amino-terminal domain that binds and activates the Arp2/3 complex, acting as a nucleation promoting factor. The acidic amino-terminal domain is followed by six and a half amino acid repeats that are able to bind filamentous actin, an alpha-helical region and a proline-rich region regulated by tyrosine and serine phosphorylation. The major Src phosphorylation sites on murine cortactin are tyrosine residues 421, 466 and 482. At the carboxy-terminal region cortactin also has an SH3 domain that binds several proteins involved in actin cytoskeleton remodeling such as N-WASP.

N-WASP is another nucleation promoting factor that activates the Arp2/3 complex. Therefore, cortactin is able to act as a nucleation promoting factor directly and indirectly through the activation of N-WASP. While serine phosphorylation of cortactin by Erk kinase promotes N-WASP activation *in vitro*, tyrosine phosphorylation of cortactin by Src kinase inhibits it. This mechanism was called the S-Y switch. The S-Y switch of cortactin seems to regulate the focal adhesion turnover and is also involved in the infection of several pathogens such as enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) or *Helicobacter pylori*. However, the role of tyrosine phosphorylated cortactin *in vivo* remains unclear, in part due to the low endogenous level of tyrosine phosphorylated cortactin detected in cells.

In addition, cortactin is regulated by lysine acetylation that occurs mainly in the repeat region and it is supposed to inhibit the binding to F-actin. Furthermore, tyrosine phosphorylation at the proline-rich domain of cortactin is able to decrease F-actin binding and crosslinking. However, how the acetylation and tyrosine phosphorylation of cortactin relate to each other had not been previously studied.

On the other side, Crk family of adaptor proteins is composed by CrkI, CrkII and CrkL isoforms that are involved in focal adhesion formation, migration and pathogenic infection. Crk adaptor proteins are constituted by an SH2 domain that binds tyrosine

phosphorylated proteins, and an SH3 domain that binds proline-rich motifs. CrkII and CrkL contain an additional atypical carboxy-terminal SH3 domain that is not able to bind proline-rich motifs, but has a regulatory function. CrkII and CrkL isoforms are regulated by tyrosine phosphorylation that takes place between the amino-terminal SH3 domain and the carboxy-terminal SH3 domain and promotes intramolecular interactions.

Although CrkII was previously located by immunofluorescence at actin-enriched structures called pedestals formed in cells infected by EPEC, the role of CrkII in pedestal formation was unknown. Furthermore, our group found that Crk family of adaptor proteins has a redundant and inhibitory role in pedestals formed by EPEC.

EPEC is an enteric Gram-negative bacterium that causes watery diarrhoea which is one of the leading causes of infant death in developing countries. EPEC infects the cell from an extracellular position, causing attaching and effacing lesions that imply the loss of intestinal microvilli, intimate attachment of the bacteria to the epithelium and the formation of protusive actin-rich structures called pedestals. The major pathway for actin polymerisation at pedestals involves the interaction of the injected bacterial effector Tir with the host adaptor protein Nck that also binds to N-WASP, which activates the Arp2/3 complex. Moreover, cortactin is involved in the actin polymerisation necessary for pedestal formation, as it is able to bind directly to Tir and activates N-WASP.

Many cellular proteins related to the actin cytoskeleton are located at pedestals formed by EPEC. As EPEC manipulates the cytoskeleton in its own benefit from an extracellular position, this pathogen represents a useful tool to investigate cellular signalling pathways.

Objectives

Part I: Study the tyrosine phosphorylation of cortactin and its effect in cell spreading.

To achieve our aims, we used a strategy termed Functional Interaction Trap (FIT) system to promote tyrosine phosphorylation of cortactin by Src kinase in cells. The FIT system consists of the expression of cortactin and the modified Src kinase lacking the SH2 and the SH3 domain, both proteins fused to complementary leucine-rich coiled coils domains termed Zip domains that force them to interact.

Using this system we explored the relationship between tyrosine phosphorylated and acetylated cortactin. In addition, we used the FIT system to address the role of tyrosine phosphorylated cortactin and its interaction with the Focal Adhesion Kinase (FAK) during cell spreading.

Part II: Study the redundant inhibitory role of Crk family adaptor proteins in pedestal formation by EPEC.

The specific goal was to investigate the mechanisms by which Crk family of adaptor proteins acts as a redundant inhibitor of pedestal formation by EPEC. To address this objective we studied the localisation of mutant Crk adaptor proteins during EPEC infection. We also analysed the phosphorylation status and the localisation of phosphorylated Crk isoforms during EPEC infection. Finally, we explored the interaction of the SH2 domain of CrkII and CrkL with EPEC effector protein Tir.

Results and Conclusions

Part I: Study the tyrosine phosphorylation of cortactin and its effect in cell spreading.

The FIT system promotes an efficient tyrosine phosphorylation of cortactin by Src kinase detected by Western Blot (WB) with phospho-specific antibodies that recognize the phosphorylated tyrosine residues 421 and 466 of cortactin. The Odyssey scanner allowed us to detect simultaneously the signals of total cortactin and phospho-cortactin by WB. To test the specificity of the system, we analysed the tyrosine phosphorylation of other proteins in cell lysates previously transfected with the FIT system, and found that other Src substrates such as paxillin, were not tyrosine phosphorylated. In addition, the non-phosphorylatable mutant of cortactin (Y421, 466, 482F) was not tyrosine phosphorylated using the FIT system. Tyrosine phosphorylated cortactin by Src kinase using the FIT system was localised by immunofluorescence at cortical structures such as lamellipodia and ruffles in agreement with endogenous cortactin distribution.

By immunoprecipitation of total transfected cortactin and tyrosine phosphorylated cortactin in HeLa cells, we found that tyrosine phosphorylated cortactin was not simultaneously acetylated, which suggested a competition between both post-translational modifications. In addition, the competition between the tyrosine phosphorylation and the acetylation of cortactin takes place in endogenous cortactin, as detected by immunoprecipitation assays using SYF and Rsrc mouse embryonic fibroblasts (MEFs) that have different levels of tyrosine phosphorylation. Moreover, as detected using MEFs deficient in HDAC6 deacetylase, one of the major deacetylase of cortactin, we found that the fraction of cortactin that is acetylated is not found tyrosine phosphorylated simultaneously.

Trying to understand the physiological consequences of our finding, we analysed the role of cortactin during the adhesion of cells to a surface covered with extracellular matrix proteins such as fibronectin, process termed cell spreading. We found that cortactin

promotes cell spreading and focal adhesion formation, in part due to its ability to interact with FAK kinase. In contrast, tyrosine phosphorylated cortactin inhibits cell spreading, probably because phospho-cortactin is no longer able to interact with FAK kinase. N-WASP binds cortactin and FAK kinase, therefore to exclude the possibility that N-WASP will act as a bridge between cortactin and FAK kinase, we analysed this interaction using N-WASP-deficient MEFs and found that N-WASP is not necessary for the interaction between cortactin and FAK.

In conclusion, the Functional Interaction Trap system promotes an efficient and specific tyrosine phosphorylation of cortactin by Src kinase. Interestingly, tyrosine phosphorylated cortactin is not simultaneously found acetylated. Indeed, cortactin promotes cell spreading, whilst tyrosine phosphorylated cortactin inhibits it, probably by disrupting its interaction with FAK kinase.

Part II: Study the redundant inhibitory role of Crk family adaptor proteins in pedestal formation by EPEC.

As mentioned, our group previously found that Crk adaptors inhibit pedestal formation by EPEC in a redundant manner. We first attempted to corroborate this result using CrkL-deficient MEFs. In fact, we found that elimination of only one Crk isoform in either CrkI/II or in CrkL-deficient MEFs promotes the overexpression of the remaining isoform; which could contribute to mask the phenotype.

Interestingly, the isolated SH2 domain of CrkII is sufficient to inhibit pedestal formation in HeLa cells infected by EPEC, probably because this domain blocks the recruitment of Nck adaptor protein to pedestals. Indeed, using recombinant proteins we demonstrated by Pull Down *in vitro* assays that the SH2 domain of CrkII and CrkL is able to interact with tyrosine phosphorylated effector Tir. This interaction is not observed with the non-phosphorylatable mutant of Tir at 474 tyrosine residue.

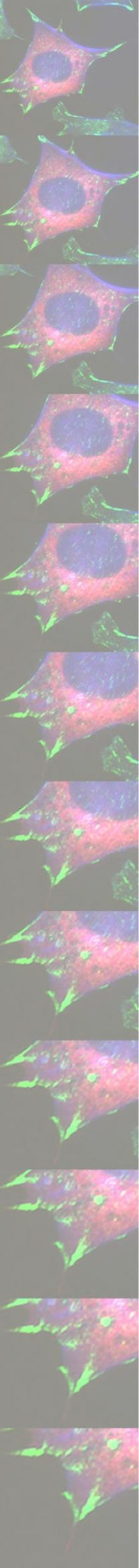
By performing immunofluorescence of HeLa cells transfected with CrkII, we found that CrkII is localised to pedestals whilst the R38V CrkII mutant which is not able to bind tyrosine phosphorylated motifs, is not.

In addition, we found that EPEC infection promotes phosphorylation of the regulatory tyrosine residue 221 in CrkII and 207 in CrkL at pedestals. The tyrosine phosphorylation of CrkII and CrkL induced by EPEC increases along the infection implicating that it would exert an effect at later times in pedestal formation. This suggests that the SH2 domain of CrkII and CrkL would rather bind their own regulatory tyrosine residue instead of tyrosine phosphorylated Tir, which would favour pedestal formation.



In conclusion, we found that the SH2 domain of CrkII is sufficient for its localisation at pedestals and plays an inhibitory role in pedestal formation, likely by blocking the recruitment of Nck adaptor protein. This could be due to the binding of CrkII and CrkL through their SH2 domain to tyrosine phosphorylated effector protein Tir. Moreover, the phosphorylation of the tyrosine 474 of Tir is crucial in order to allow this interaction. Furthermore, EPEC infection promotes tyrosine phosphorylation of CrkII and CrkL at pedestals, thus likely preventing the inhibitory role of these adaptors in pedestal formation.

RESUMEN



RESUMEN

Estudio de la proteína cortactina en la adhesión celular y de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación del pedestal de actina por *Escherichia coli* enteropatógena

Introducción

El citoesqueleto de actina es una red dinámica compuesta por filamentos de actina, la cual es remodelada en diferentes procesos celulares como la adhesión celular, la migración celular y la infección por diversos patógenos.

Cortactina es una proteína de unión a filamentos de actina que fue inicialmente identificada como sustrato de la proteína tirosina quinasa Src. Cortactina es una proteína multidominio compuesta por un dominio amino-terminal ácido que es capaz de unir y activar al complejo Arp2/3, actuando como un factor promotor de la nucleación. A continuación presenta una región compuesta por seis repeticiones y media de 37 aminoácidos, por la cual es capaz de unir filamentos de actina (actina-F). Seguidamente contiene una región en alfa hélice y una región rica en residuos de prolina regulada por fosforilación en residuos de serina y de tirosina. Los principales residuos de tirosina de cortactina de ratón susceptibles de fosforilación por la proteína tirosina quinasa Src se encuentran localizados en las posiciones 421, 466 y 482. En el extremo carboxilo terminal cortactina presenta un dominio SH3 por el cual es capaz de interaccionar con distintas proteínas implicadas en el remodelado del citoesqueleto de actina, tales como N-WASP.

N-WASP es uno de los principales factores promotores de la nucleación que activa al complejo Arp2/3. Cortactina es capaz de promover la polimerización de actina activando al complejo Arp2/3 de forma directa o de forma indirecta activando a la proteína N-WASP. Según un modelo propuesto basado en estudios *in vitro*, la fosforilación de cortactina en residuos de serina por la proteína serina/treonina quinasa Erk promueve la activación de N-WASP, mientras que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src la inhibe. Por tanto, estas modificaciones post-traduccionales funcionarían como un mecanismo “interruptor encendido-apagado” de cortactina. Este mecanismo parece regular la dinámica de las adhesiones focales y está implicado en la infección por diversos patógenos como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) o *Helicobacter pylori*. Sin embargo, el papel de la fosforilación de cortactina en residuos de

tirona *in vivo* no había sido esclarecido, en parte debido a que los niveles endógenos de esta modificación post-traducciona de cortactina en la célula son bajos.

Además, se ha descrito que cortactina puede estar regulada por un mecanismo de acetilación/deacetilación en lisinas que ocurre principalmente en la zona de las repeticiones. Tanto la fosforilación en residuos de tirosina como la acetilación en residuos de lisina de cortactina disminuyen la unión de actina-F. Sin embargo, la relación entre estas modificaciones post-traduccionales no había sido previamente estudiada.

Por otra parte, la familia Crk de proteínas adaptadoras está compuesta por las isoformas CrkI, CrkII y CrkL. Las proteínas de la familia Crk se caracterizan por presentar un único dominio SH2 que une proteínas con motivos fosforilados en residuos de tirosina y un dominio SH3 que reconoce proteínas con regiones ricas en residuos de prolina. Además, las isoformas CrkII y CrkL presentan un dominio SH3 atípico en posición carboxilo-terminal que presenta una función regulatoria. Asimismo, las isoformas CrkII y CrkL están reguladas por la fosforilación en un residuo de tirosina situado entre el dominio SH3 amino-terminal y el dominio SH3 carboxilo-terminal, lo cual promueve interacciones intramoleculares impidiendo la interacción con otras proteínas de unión.

Aunque inicialmente se describió mediante inmunofluorescencia que CrkII se localiza en unas estructuras ricas en actina denominadas pedestales originadas durante la infección por EPEC, su función en estas estructuras se desconocía. Posteriormente, nuestro grupo descubrió que la familia Crk de proteínas adaptadoras presenta un papel inhibitorio y redundante en la formación del pedestal de actina por EPEC.

EPEC es una bacteria entérica Gram-negativa y representa una de las principales causas de muerte infantil por diarrea en los países en vías de desarrollo. EPEC infecta a las células desde una posición extracelular y produce unas lesiones denominadas *attaching and effacing*. Estas lesiones implican la pérdida de microvellosidades intestinales, la adherencia íntima de la bacteria al epitelio intestinal y la formación de unas estructuras ricas en actina denominadas pedestales. La principal ruta de polimerización de actina en los pedestales implica la interacción de una proteína efectora bacteriana denominada Tir fosforilada en residuos de tirosina con la proteína adaptadora celular Nck que a su vez interacciona con la proteína N-WASP, la cual activa al complejo Arp2/3. Además, cortactina está implicada en la polimerización de actina necesaria para la formación del pedestal, ya que es capaz de unir directamente a Tir y activar a N-WASP.

Numerosas proteínas asociadas al citoesqueleto de actina se localizan en los pedestales formados por EPEC. EPEC es capaz de manipular el citoesqueleto de la célula en

su propio beneficio desde una posición extracelular. Por tanto, este patógeno representa una estrategia muy útil para el estudio de las rutas de señalización intracelular.

Objetivos

Parte I: Estudio de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina y su efecto en el *spreading* celular

Para llevar a cabo este objetivo se ha empleado un sistema denominado *Functional Interaction Trap* (FIT) que promueve la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src *in vivo*. El sistema FIT consiste en la expresión de cortactina y de la proteína tirosina quinasa Src, carente de sus dominios SH2 y SH3, ambas proteínas fusionadas a unas hélices sintéticas complementarias ricas en residuos de leucina, denominadas Zip que fuerzan su interacción.

Este sistema ha sido empleado para estudiar la relación entre la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación en residuos de lisina de cortactina. Además, el sistema FIT ha sido utilizado para analizar el papel de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina en el *spreading* celular y así como su interacción con la proteína *Focal Adhesion Kinase* (FAK) durante este proceso.

Parte II: Estudio del papel inhibitorio y redundante de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación de pedestales por EPEC

El objetivo específico fue investigar el mecanismo por el cual la familia de proteínas adaptadoras Crk desempeñan una función inhibitoria y redundante en la formación de pedestales de actina por EPEC. Para llevar a cabo este objetivo se estudió la localización de diferentes mutantes de Crk durante la infección por EPEC. Además se analizó el estatus de fosforilación y la localización de las isoformas de Crk fosforiladas durante la infección por EPEC. Finalmente se analizó la interacción del dominio SH2 aislado de las proteínas CrkII y CrkL con la proteína efectora bacteriana Tir.

Resultados y Conclusiones

Parte I: Estudio de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina y su efecto en el *spreading* celular

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral muestran que el sistema FIT permite una fosforilación eficiente de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src, lo cual ha sido detectado mediante análisis por *Western Blot* (WB) con anticuerpos fosfo-específicos que reconocen cortactina fosforilada en los residuos de

tirosina 421 y 466. El escáner *Odyssey* ha permitido detectar de forma simultánea la señal de cortactina total y de cortactina fosforilada mediante análisis por WB. Para comprobar la especificidad del sistema se analizó la fosforilación en residuos de tirosina de otras proteínas empleando lisados de células previamente transfectadas con el sistema FIT.

Dicho análisis indicó que el sistema FIT no potencia inespecíficamente la fosforilación en residuos de tirosina de otros sustratos de Src tales como paxilina. Además el mutante no fosforilable de cortactina (Y421, 466, 482F) no es fosforilado en residuos de tirosina por la quinasa Src mediante el sistema FIT. Por otra parte, mediante inmunofluorescencia se observó que cortactina fosforilada en residuos de tirosina por la quinasa Src haciendo uso del sistema FIT se localiza en estructuras corticales de la célula, como en las zonas de *lamellipodia* y *ruffles* en concordancia con la localización de cortactina endógena.

Mediante inmunoprecipitación de cortactina transfectada y cortactina fosforilada en residuos de tirosina en células HeLa se descubrió que la fracción de cortactina fosforilada en residuos de tirosina no es acetilada simultáneamente, lo cual sugiere un mecanismo de competición entre ambas modificaciones post-traduccionales. Además esta relación de competición entre cortactina fosforilada y cortactina acetilada se observa también en inmunoprecipitados de cortactina endógena empleando fibroblastos embrionarios de ratón SYF y Rsrc que presentan diferentes niveles de fosforilación en residuos de tirosina. Asimismo en los inmunoprecipitados de cortactina acetilada empleando fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de la deacetilasa HDAC6, una de las principales deacetilasas de cortactina, no se observa fosforilación en residuos de tirosina.

Para explicar las consecuencias fisiológicas de nuestros resultados decidimos analizar el papel de cortactina durante la adhesión de las células a un sustrato recubierto por proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, proceso conocido como *spreading* celular. Los resultados obtenidos en este estudio indican que cortactina promueve el *spreading* celular y la formación de adhesiones focales, en parte debido a su capacidad de interaccionar con la quinasa FAK. Mientras que cortactina fosforilada en residuos de tirosina inhibe el *spreading* celular, probablemente debido a que no es capaz de interaccionar con la quinasa FAK. La proteína N-WASP es capaz de interaccionar con cortactina y con la quinasa FAK, por tanto para excluir la posibilidad de que N-WASP esté mediando la interacción entre estas dos proteínas se analizó la interacción de cortactina y FAK mediante ensayo *Pull Down* en fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de N-WASP. El análisis de dicha interacción muestra que la proteína N-WASP no es necesaria para la interacción entre cortactina y FAK.

En conclusión, el sistema *Functional Interaction Trap* promueve la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src de forma eficiente y específica. Cortactina fosforilada en residuos de tirosina no es acetilada de forma simultánea. Además, cortactina promueve el *spreading* celular mientras que cortactina fosforilada en residuos de tirosina lo inhibe, impidiendo su interacción con la quinasa FAK. La interacción de cortactina y la quinasa FAK no está medida por N-WASP.

Parte II: Estudio del papel inhibitorio y redundante de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación de pedestales por EPEC

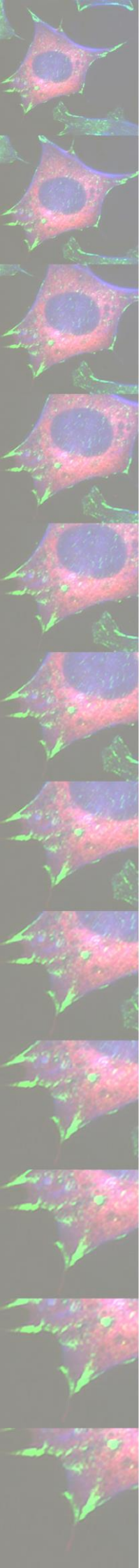
Como se ha mencionado, previamente nuestro grupo demostró que las isoformas de la familia Crk tienen un papel inhibitorio y redundante en la formación de pedestales de actina por EPEC. Por tanto, en el presente trabajo inicialmente se emplearon fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *CrkL* para corroborar dicho resultado. Además, mediante análisis por WB se observó que la eliminación de una de las isoformas de la familia Crk en los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *CrkI/II* o *CrkL* promueve la sobreexpresión de la isoforma restante, lo cual podría enmascarar el fenotipo de estas líneas celulares.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral indican que el dominio SH2 es suficiente para la localización de CrkII en los pedestales de actina formados por EPEC en células HeLa. Este dominio presenta un papel inhibitorio en la formación de pedestales, probablemente debido a que impide la localización de Nck en estas estructuras. Además mediante ensayos *Pull Down* empleando proteínas recombinantes demostramos que el dominio SH2 aislado de CrkII y de CrkL es capaz de interaccionar con la proteína efectora bacteriana Tir fosforilada en residuos de tirosina. Mientras que esta interacción no se observa con el mutante de Tir no fosforilable en el residuo de tirosina 474. Mediante inmunofluorescencia de células HeLa transfectadas con CrkII, se observó que CrkII se localiza en los pedestales a diferencia del mutante R38V CrkII, el cual es incapaz de unir proteínas con motivos fosforilados en residuos de tirosina.

Además, EPEC promueve la fosforilación en el residuo de tirosina regulatorio de CrkII (Y221) y CrkL (Y207) en los pedestales, lo cual podría bloquear el papel inhibitorio de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación de estas estructuras. La fosforilación en residuos de tirosina de CrkII y CrkL inducida por EPEC aumenta a lo largo del tiempo de infección. Por tanto a tiempos tardíos de infección, el dominio SH2 presente en CrkII y CrkL interaccionaría con su propio residuo de tirosina regulatorio fosforilado en vez de con la proteína efectora Tir fosforilada en residuos de tirosina, lo cual favorecería la formación del pedestal.

En conclusión, el dominio SH2 aislado de CrkII es suficiente para su localización en los pedestales. Además, este dominio es capaz de inhibir la formación de los pedestales, probablemente debido a que impide la localización de la proteína adaptadora Nck en estas estructuras. Esto podría deberse a que CrkII y CrkL son capaces de interactuar a través de su dominio SH2 con la proteína efectora bacteriana Tir, para lo cual se requiere la fosforilación del residuo de tirosina 474 de Tir. Por otra parte, la infección por EPEC promueve la fosforilación del residuo de tirosina regulatorio de CrkII y CrkL en los pedestales, lo cual podría bloquear el efecto inhibitorio de estas proteínas adaptadoras en la formación de pedestales de actina por EPEC.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. El citoesqueleto de actina

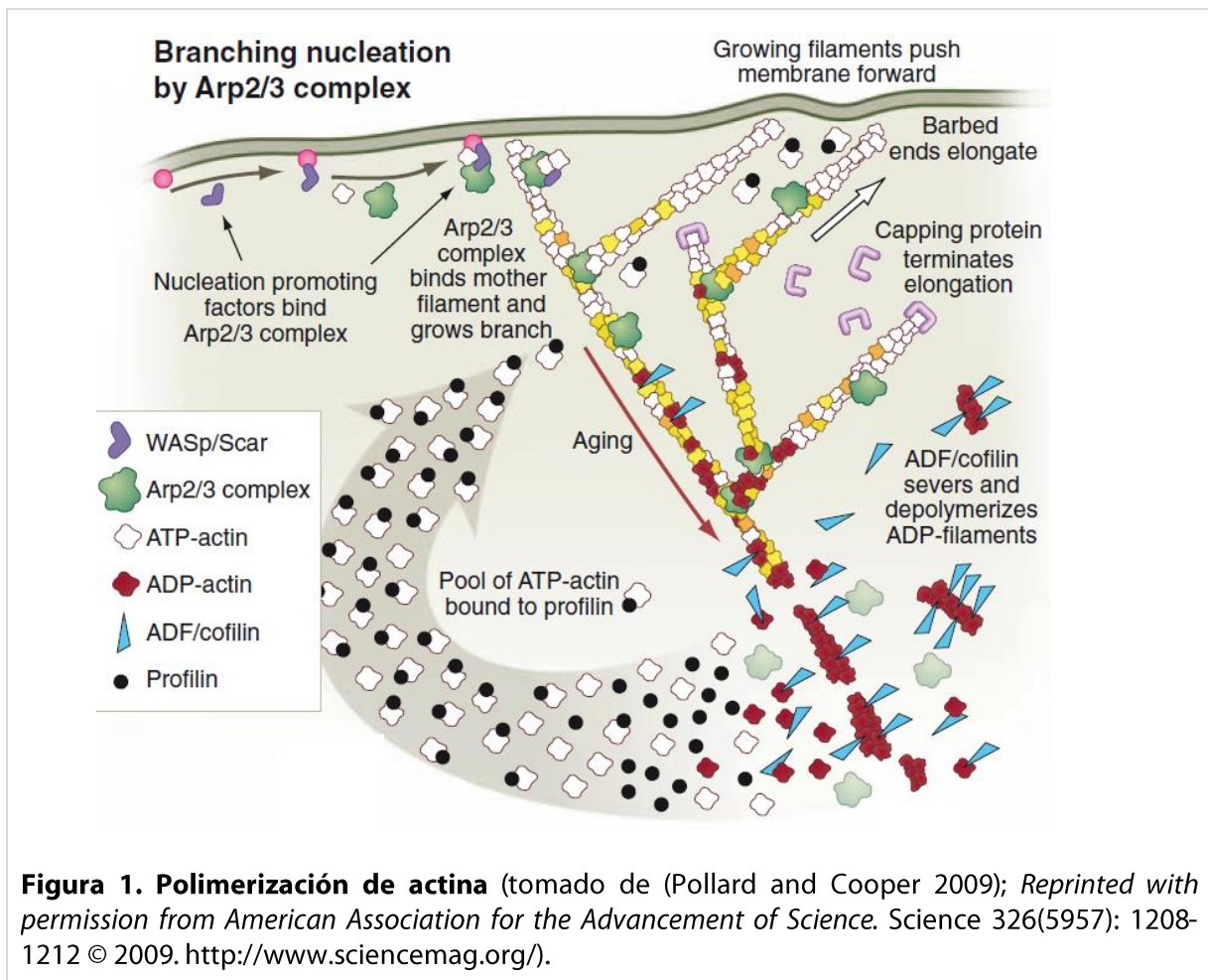
El citoesqueleto de las células animales está compuesto por distintos polímeros proteicos denominados filamentos intermedios, microtúbulos y filamentos de actina. La actina es una proteína monomérica altamente conservada y abundante en las células eucariotas. Esta proteína es capaz de polimerizar en doble hélice formando filamentos que componen el citoesqueleto de actina. El citoesqueleto de actina está implicado en el mantenimiento de la morfología celular, en la adhesión celular y en la migración de la célula, entre otros (revisado en (Pollard and Cooper 2009)). Asimismo, el citoesqueleto de actina de las células está alterado en diversas patologías, tales como el cáncer (revisado en (Stevenson, Veltman *et al.* 2012)) o la infección por patógenos (revisado en (Haglund and Welch 2011; Welch and Way 2013)).

1.1 Polimerización de actina

Los filamentos de actina (actina-F) están compuestos por la polimerización de monómeros de actina globular (actina-G). Los filamentos de actina son estructuras polarizadas que poseen un extremo positivo (en inglés *barbed end*) y un extremo negativo (en inglés *pointed end*). El extremo positivo del filamento incorpora nuevos monómeros de actina-G a mayor velocidad que el extremo negativo. La actina-G es capaz de unir un nucleótido de adenina difosfato o trifosfato (ADP o ATP), y de hidrolizar el ATP unido una vez el monómero de actina se ha incorporado al filamento. Este proceso está altamente regulado por proteínas de unión a actina-G y a actina-F (revisado en (Pollard and Cooper 2009)).

La polimerización de actina puede iniciarse *de novo* o a partir de filamentos preexistentes. La formación de filamentos *de novo* a partir de monómeros de actina comienza con la formación de dímeros o trímeros de actina, proceso conocido como nucleación. La nucleación es cinéticamente desfavorable, por ello existen proteínas nucleadoras que favorecen este proceso. Los principales nucleadores de actina son el complejo Arp2/3 (*Actin-related protein 2/3*) y las proteínas de la familia de las forminas. Además, se ha descrito un tercer grupo de nucleadores de actina compuesto por las proteínas Spire, cordon-blue y leiomodín. Este último grupo se caracteriza por presentar varios dominios repetidos de unión a actina monomérica, como el dominio WH2 (*WASP Homology 2*), que promueven la formación de filamentos de actina no ramificados (revisado en (Campellone and Welch 2010)).

El complejo Arp2/3 está compuesto por siete subunidades proteicas que incluyen ARP (*Actin-Related Protein*) 2, ARP3 y cinco subunidades adicionales ARPC (*Actin-Related Protein Component*) 1–5. Este complejo se une a un filamento de actina preexistente originando un nuevo extremo positivo. El nuevo filamento se genera con un ángulo de 70 grados con respecto al filamento preexistente dando lugar a filamentos de actina ramificados (Figura, Fig. 1). El complejo Arp2/3 queda incorporado en el punto de ramificación del nuevo filamento, estabilizándolo. A su vez, el complejo Arp2/3 necesita ser activado por unas proteínas denominadas factores promotores de la nucleación (NPFs, *Nucleation Promoting Factors*) (revisado en (Campellone and Welch 2010)).



Las forminas promueven la formación de filamentos de actina no ramificados. Esta familia de proteínas se caracteriza por presentar dos dominios conservados de homología a forminas (FH, *Formin Homology*): FH1 y FH2.

Por otra parte, existen proteínas implicadas en el desensamblaje de filamentos de actina antiguos y en la generación de extremos libres, los cuales son necesarios para la polimerización de actina. La proteína cofilina perteneciente a la familia Cofilina/ADF (*Actin-Depolymerizing Factor*) participa en la generación de nuevos extremos libres cortando los

filamentos de actina preexistentes (Ichetovkin, Grant *et al.* 2002). Cofilina también contribuye a la despolimerización de filamentos de actina antiguos manteniendo una concentración de monómeros de actina adecuada para su polimerización (Carlier, Laurent *et al.* 1997). Por otra parte, la proteína coronina se une a los filamentos de actina en el mismo punto que el complejo Arp2/3 y altera el ángulo de ramificación, lo cual favorece el desensamblaje de los filamentos de actina ramificados. Este desensamblaje puede estar coordinado por la proteína cofilina (revisado en (Campellone and Welch 2010)).

1.2 Factores promotores de la nucleación

Tradicionalmente se han descrito dos clases de NPFs (revisado en (Higgs and Pollard 2001)). Los NPFs de la clase I activan al complejo Arp2/3 a través un dominio carboxilo terminal ácido VCA (*Verprolin-homology, Cofilin-homology or Central, Acidic*). Esta clase incluye a la familia de proteínas WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) que está agrupada en las subfamilias WASP y WAVE (*WASP family Verprolin-homologous protein*). La subfamilia WASP está formada por las proteínas WASP y N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*). Mientras que la subfamilia WAVE, también conocida como SCAR (*Suppressor of cAMP Receptor*) presenta tres miembros: WAVE1, WAVE2 y WAVE3.

En los últimos años se han identificado nuevos miembros de la familia WASP en mamíferos que promueven la actividad del complejo Arp2/3 en distintas localizaciones de la célula. Los nuevos miembros de la familia WASP se denominan WASH (*WASP and Scar Homolog*), WHAMM (*WASP Homology associated with Actin, Membranes, and Microtubules*) y JMY (*Junction-Mediating and -regulatory protein*) (revisado en (Burianek and Soderling 2013)).

WASP y N-WASP son los factores promotores de la nucleación mejor caracterizados. WASP es la proteína que da nombre a la familia y está codificada por el gen *WAS*, mutado en la inmunodeficiencia del Síndrome de Wiskott-Aldrich (Derry, Ochs *et al.* 1994). WASP se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas. Mientras que N-WASP presenta una expresión ubicua, aunque fue identificado inicialmente en tejido cerebral, de ahí su nombre (Miki, Miura *et al.* 1996).

WASP y N-WASP están compuestas por un dominio WH1 (*WASP Homology 1*) en el extremo amino terminal, seguido por una zona básica, un dominio GBD (*GTPase-Binding Domain*) de interacción con GTPasas (Trifosfatasa de Guanosina) y una región rica en residuos de prolina (PRR, *Proline-Rich Region*). Además, en el extremo carboxilo terminal presentan un dominio conservado VCA. El dominio VCA, presenta una secuencia de

homología a verprolina que une actina-G y una región conectora seguida de una secuencia ácida, por la cual interacciona con el complejo Arp2/3 (Rohatgi, Ho *et al.* 2000).

WASP y N-WASP presentan una conformación autoinhibitoria por interacciones intramoleculares entre el dominio GBD y el dominio VCA. La unión de Cdc42 (*Cell division cycle 42*) al dominio GBD de WASP libera el dominio VCA y permite su interacción con el complejo Arp2/3 promoviendo su activación (Kim, Kakalis *et al.* 2000). La activación de N-WASP mediada por Cdc42 es favorecida por la unión de PIP₂ (*Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate*) a la zona básica (Rohatgi, Ho *et al.* 2000). Además, WASP y N-WASP están regulados por la interacción con otras proteínas en sus distintos dominios, tales como WIP (*WASP-Interacting Protein*) (Martinez-Quiles, Rohatgi *et al.* 2001), así como por distintas modificaciones post-traduccionales (revisado en (Burianek and Soderling 2013)).

La clase II de NPFs en mamíferos está formada por la proteína cortactina de expresión ubicua y por su proteína homóloga en el sistema inmune HS1 (*Hematopoietic Specific 1*) (revisado en (Martinez-Quiles 2013)). La clase II de NPFs interacciona con el complejo Arp2/3 a través de su extremo amino terminal (Weed, Karginov *et al.* 2000; Uruno, Zhang *et al.* 2003) y es capaz de unir actina-F estabilizando los puntos de ramificación en los filamentos de actina (Weaver, Karginov *et al.* 2001).

2. Cortactina

Cortactina fue inicialmente identificada como sustrato de la proteína tirosina quinasa Src (*Sarcoma tyrosine kinase*) (Wu, Reynolds *et al.* 1991). Cortactina fue descrita como una proteína capaz de unir filamentos de actina, la cual se localiza en la región cortical de la célula y se acumula en zonas de polimerización de actina dinámicas (Wu and Parsons 1993). Esta proteína está codificada por el gen *CTTN* (*Cortactin*, anteriormente denominado gen *EMS1*) localizado en la región cromosómica 11q13 (Schuuring, Verhoeven *et al.* 1993).

El gen *CTTN* se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer que presentan la región cromosómica 11q13 amplificada, como en carcinoma de mama y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Schuuring, Verhoeven *et al.* 1992). Además, cortactina regula la invasión de tejidos por células tumorales y se emplea como un marcador *bona fide* de las invadopodias, que son protusiones de membrana ricas en actina implicadas en la degradación de la matriz extracelular (revisado en (Kirkbride, Sung *et al.* 2011)). Actualmente, cortactina es considerada un biomarcador potencial de la progresión de tumores y de la supervivencia de pacientes con determinados tipos de carcinomas (revisado en (Rodrigo, Garcia-Pedrero *et al.* 2012)).

Cortactina está implicada en numerosos procesos celulares asociados con la remodelación del citoesqueleto de actina como adhesión celular, migración y endocitosis (revisado en (Ren, Crampton *et al.* 2009)). Además, cortactina es una proteína diana de diversos microorganismos patógenos que manipulan el citoesqueleto de actina en su beneficio (revisado en (Selbach and Backert 2005)). Cortactina está implicada en la formación de estructuras enriquecidas en actina denominadas pedestales, generadas por la infección de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC, *Enteropathogenic Escherichia coli*) (Cantarelli, Takahashi *et al.* 2002). Asimismo, cortactina es capaz de regular el alargamiento celular, también conocido como “fenotipo colibrí”, producido por la infección de *Helicobacter pylori* (Selbach, Moese *et al.* 2003; Tegtmeyer, Wittelsberger *et al.* 2011) y la internalización de *Coxiella burnetii*, entre otros (Rosales, Aguilera *et al.* 2012).

2.1 Estructura de cortactina

Cortactina es una proteína multidominio, compuesta por un dominio ácido en el extremo amino terminal (N-terminal) denominado dominio NTA (*Amino-Terminal Acidic*) (Fig. 2). A continuación, presenta una región conocida como ABR (*Actin-Binding Region*) compuesta por seis repeticiones y media de 37 aminoácidos, por la cual es capaz de unir filamentos de actina (Wu and Parsons 1993). Seguidamente presenta una región en α -hélice, un dominio PRR y finalmente un dominio SH3 (*Src Homology 3*) en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) (Wu, Reynolds *et al.* 1991).

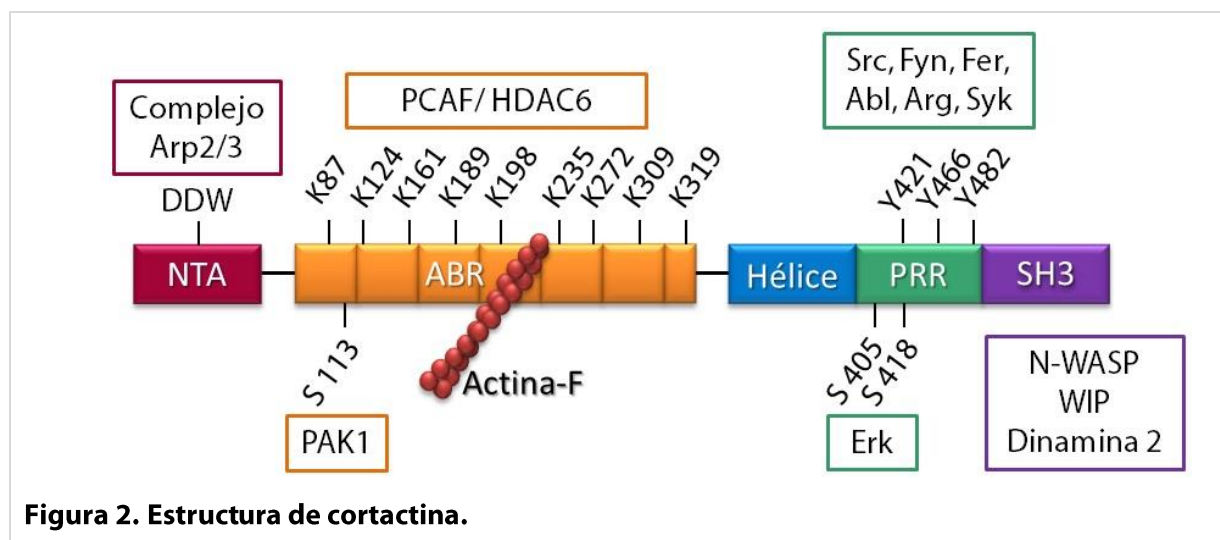


Figura 2. Estructura de cortactina.

Cortactina contiene un motivo aminoacídico ${}_{20}\text{DDW}_{22}$ (en la secuencia de ratón) en el dominio NTA, por el cual interacciona y es capaz de activar débilmente *in vitro* al complejo Arp2/3 (Weed, Karginov *et al.* 2000; Uruno, Liu *et al.* 2001). Esta activación requiere del dominio NTA y del dominio ABR de cortactina. Además, cortactina estabiliza los puntos de ramificación de los filamentos de actina formados (Weaver, Karginov *et al.* 2001). Por otra

parte, el dominio SH3 de cortactina es capaz de promover indirectamente la activación del complejo Arp2/3 *in vitro*, mediante la interacción y posterior activación de N-WASP (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004).

La cuarta repetición de cortactina es fundamental para su unión a actina-F (Weed, Karginov *et al.* 2000). El procesamiento alternativo del gen que codifica para cortactina da lugar a dos isoformas que poseen 4 o 5 repeticiones, en lugar de 6 repeticiones y media (Ohoka and Takai 1998). La pérdida de estas repeticiones afecta a la capacidad de entrecruzar filamentos de actina y contribuye a una reducción en la migración celular. Además, la isoforma de cortactina que carece de la quinta y la sexta repetición presenta una capacidad menor de unir actina-F y de activar el complejo Arp2/3. Por tanto, la expresión de estas variantes podría suponer un mecanismo adicional para regular la dinámica de actina en la célula (van Rossum, de Graaf *et al.* 2003).

Cortactina también es capaz de interaccionar a través del dominio PRR fosforilado en residuos de tirosina con proteínas con dominio SH2 (*Src Homology 2*), que reconocen motivos específicos con residuos de tirosina fosforilados, como las proteínas Nck1/2 (*Non-catalytic tyrosine kinase*), denominadas Nck de forma genérica en el presente estudio (Okamura and Resh 1995). Nck es una proteína adaptadora compuesta por tres dominios SH3 y un dominio SH2, implicada en la formación de complejos proteicos (Buday, Wunderlich *et al.* 2002). Además, cortactina es capaz de interaccionar a través de su dominio SH3 con el dominio PRR de numerosas proteínas implicadas en la regulación de la polimerización de actina tales como N-WASP, WIP o dinamina-2, entre otras (revisado en (Ammer and Weed 2008)).

Por otra parte, la masa molecular estimada de cortactina es de 63–65 kDa (kiloDalton). Sin embargo, cortactina migra como un doblete de 80/85 kDa mediante electroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Wu, Reynolds *et al.* 1991). Este doblete se ha atribuido a cambios conformacionales de la proteína, a modificaciones post-traduccionales e incluso a las isoformas generadas por el procesamiento alternativo del gen *CTTN*. Actualmente el mecanismo por el cual se origina el doblete de 80/85 kDa de cortactina está pendiente de elucidar (revisado en (Evans, Kelley *et al.* 2011)).

Cortactina fue inicialmente identificada como un monómero en conformación extendida, mediante un estudio de microscopía electrónica de la proteína (Weaver, Heuser *et al.* 2002). Un estudio estructural posterior ha revelado que cortactina también puede adoptar una conformación globular en solución. Además, dicho trabajo indica que cortactina está cerrada mediante interacciones intramoleculares del dominio SH3 con la

zona de repeticiones y la región en alfa hélice (Cowieson, King *et al.* 2008). Estos resultados están en concordancia con trabajos previos, los cuales sugieren que la accesibilidad del dominio SH3 de cortactina podría estar condicionada por interacciones intramoleculares de la proteína (Campbell, Sutherland *et al.* 1999; Martínez-Quiles, Ho *et al.* 2004).

2.2 Regulación de cortactina por fosforilación/desfosforilación

El dominio PRR de cortactina contiene varias posiciones susceptibles de ser fosforiladas por proteínas tirosina quinasas y por proteínas serina/treonina quinasas. Los niveles basales de fosforilación de cortactina en residuos de tirosina son prácticamente indetectables en la mayoría de las líneas celulares mediante análisis por *Western Blot* (WB).

La fosforilación de cortactina en residuos de tirosina es inducida en respuesta a la señalización desencadenada por diversos estímulos, entre los que se incluyen la adhesión a la matriz extracelular mediada por integrinas (Vuori and Ruoslahti 1995), los factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *Fibroblast Growth Factor*) (Zhan, Hu *et al.* 1993) o el factor de crecimiento epidermal (EGF, *Epidermal Growth Factor*) (Maa, Wilson *et al.* 1992), entre otros. Asimismo, cortactina es fosforilada en residuos de tirosina en respuesta a la infección por determinados patógenos como EPEC (Cantarelli, Kodama *et al.* 2007; Nieto-Pelegrin and Martínez-Quiles 2009).

La proteína tirosina quinasa Src es la principal quinasa que fosforila a cortactina de ratón en los residuos de tirosina 421, 466, 482 y en menor medida en el residuo Y485 (Huang, Liu *et al.* 1998). Estos residuos de tirosina corresponden a las posiciones Y421, Y470 y Y486 en cortactina humana. La fosforilación de cortactina en residuos de tirosina parece ser un proceso progresivo, ya que la fosforilación en el residuo Y421 es necesaria para la fosforilación del residuo Y466 (Head, Jiang *et al.* 2003). Además, un estudio de cortactina basado en técnicas de espectrometría de masas ha identificado que el residuo de tirosina 475 es susceptible de ser fosforilado, aunque aún no se conoce la proteína tirosina quinasa responsable de fosforilar dicha posición (Martin, Jeffery *et al.* 2006).

Cortactina también es sustrato de otras proteínas tirosina quinasas como Syk (*Spleen tyrosine kinase*) (Maruyama, Kurosaki *et al.* 1996; Zhang, Shrikhande *et al.* 2009), Abl (*Abelson tyrosine kinase*), Arg (*Abl-related gene*) (Boyle, Michaud *et al.* 2007; Lapetina, Mader *et al.* 2009), Fer (*Feline sarcoma-related*) (Sangrar, Gao *et al.* 2007) y ACK1 (*Activated Cdc42-associated Kinase 1*) (Kelley and Weed 2012).

La fosforilación de cortactina en residuos de tirosina parece ser un proceso reversible, ya que se ha descrito que la proteína tirosina fosfatasa PTP1B (*Protein-Tyrosine Phosphatase 1B*) es capaz de desfosforilar cortactina de ratón en el residuo de tirosina 421 (Mertins,

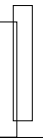
Eberl *et al.* 2008) y cortactina humana en los residuos de tirosina 421 y 446 (Stuible, Dube *et al.* 2008).

Actualmente no está claro si la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina ejerce algún efecto en su estructura tridimensional o en su actividad sobre el complejo Arp2/3. Sin embargo, la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina en el extremo C-terminal requiere del extremo N-terminal (Head, Jiang *et al.* 2003). Esto podría deberse a que cortactina parece interaccionar en la zona de las repeticiones mediante puente disulfuro del residuo de cisteína 112 o del 246 con el residuo de cisteína 185 del dominio SH2 de la proteína tirosina quinasa Src (Evans, Ammer *et al.* 2012).

Además, la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina disminuye el entrecruzamiento de actina-F y la unión de actina-F en la zona de las repeticiones (Huang, Ni *et al.* 1997). La zona de las repeticiones de cortactina es necesaria para la activación del complejo Arp2/3 (Weaver, Karginov *et al.* 2001). Por otra parte, la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina favorece su proteólisis por calpaína, la cual ocurre entre la zona de las repeticiones y el dominio en alfa hélice de cortactina (Huang, Tandon *et al.* 1997; Perrin, Amann *et al.* 2006).

Asimismo, la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src inhibe la activación de N-WASP *in vitro* (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004). Por el contrario, cortactina fosforilada en residuos de tirosina también parece tener un efecto positivo en la polimerización de actina al interaccionar con la proteína adaptadora Nck. A su vez, Nck es capaz de interaccionar con N-WASP y WIP promoviendo la activación del complejo Arp2/3 *in vitro* (Tehrani, Tomasevic *et al.* 2007).

Los niveles elevados de cortactina fosforilada en residuos de tirosina se asocian a un aumento de la migración celular (Huang, Asawa *et al.* 2003; Wang, Liu *et al.* 2011). Además, la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina es necesaria para la formación y maduración de las invadopodias (Clark, Whigham *et al.* 2007; Ayala, Baldassarre *et al.* 2008) y de los podosomas (Tehrani, Faccio *et al.* 2006). Los podosomas son estructuras adhesivas ricas en actina situadas en la zona ventral de células no cancerosas como osteoclastos, células dendríticas, macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas (revisado en (Hoshino, Branch *et al.* 2013)). Los podosomas también son capaces de degradar la matriz extracelular, aunque en menor medida que las invadopodias. Las invadopodias y podosomas se denominan conjuntamente invadosomas. Estas estructuras son típicas de fibroblastos transformados por la proteína tirosina quinasa v-Src (*viral Sarcoma*) (revisado en (Linder, Wiesner *et al.* 2011)).



Por otra parte, cortactina también puede ser fosforilada en residuos de serina. La proteína serina/treonina quinasa Erk (*Extracellular-signal-regulated protein kinase*) es capaz de fosforilar a cortactina en los residuos de serina S405, S418 (en la secuencia de humano) (Campbell, Sutherland *et al.* 1999). La fosforilación de cortactina en residuos de serina por la quinasa Erk inducida por EGF está asociada a su desplazamiento en la movilidad electroforética de 80 a 85 kDa, lo cual sugiere que esta modificación favorece un cambio conformacional de cortactina (van Damme, Brok *et al.* 1997; Campbell, Sutherland *et al.* 1999).

Estudios más recientes han demostrado que la fosforilación de cortactina en residuos de serina por la quinasa Erk no es suficiente para inducir el desplazamiento en la movilidad electroforética de cortactina a 85 kDa (Kelley, Hayes *et al.* 2010). Por otra parte, la inhibición de la familia de proteínas tirosina quinasas Src bloquea el desplazamiento a la forma de 85 kDa. Esto sugiere que intervienen otros factores en el retraso de la movilidad electroforética y no solo la fosforilación de cortactina en residuos de serina (revisado en (Evans, Kelley *et al.* 2011)).

Además, la fosforilación de cortactina en residuos de serina por la quinasa Erk promueve la interacción de cortactina con N-WASP, activando la polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3 *in vitro* (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004). La fosforilación de los residuos de serina 405 y 418 de cortactina parece ser necesaria para la motilidad y adhesión de las células de carcinoma, así como para la persistencia de la *lamellipodia* (extensión plana de membrana compuesta por filamentos de actina ramificados que se originan en el borde de la célula) (Kelley, Hayes *et al.* 2010).

La proteína quinasa Pak1 (*p21 activated kinase1*) también fosforila a cortactina en los residuos de serina 405 y 418 (Grassart, Meas-Yedid *et al.* 2010). Un estudio mencionado anteriormente basado en técnicas de espectrometría de masas ha identificado 12 residuos de serina y 4 residuos de treonina en cortactina que son susceptibles de ser fosforilados, además de los ya descritos (Martin, Jeffery *et al.* 2006). Uno de estos residuos es la serina 113 que es fosforilada por Pak3 (Webb, Zhou *et al.* 2006). Mientras que la quinasa PKD (*Protein kinase D*) es capaz de fosforilar a cortactina en los residuos de serina 298 y 348 (en la secuencia de humano) (De Kimpe, Janssens *et al.* 2009).

En el trabajo de Martinez-Quiles *et al.* 2004 realizado por la investigadora principal de nuestro grupo, se propone un modelo en el que las fosforilaciones de cortactina por la proteína serina/treonina quinasa Erk y la proteína tirosina quinasa Src funcionarían como un “interruptor de encendido y apagado” que regularía la interacción entre cortactina y la proteína N-WASP. Como se ha mencionado anteriormente, la fosforilación de cortactina en

residuos de serina por la quinasa Erk, promueve la interacción directa de cortactina con la proteína N-WASP y su posterior activación *in vitro*. Mientras que cortactina fosforilada en residuos de tirosina por la quinasa Src inhibe la activación de N-WASP *in vitro* (Martínez-Quiles, Ho *et al.* 2004). Además en el modelo se propone que estas modificaciones post-traduccionales probablemente controlarían la accesibilidad del dominio SH3 de cortactina.

El modelo “interruptor encendido y apagado” de cortactina renombrado como “SY-switch” (Interruptor Serina-Tirosina por Lua and Low 2005) ha tenido una importante repercusión en múltiples campos de estudio de la motilidad celular y bacteriana (Lua and Low 2005; Selbach and Backert 2005). La fosforilación de cortactina en residuos de serina o de tirosina es inducida por la infección de determinados patógenos, en concordancia con el modelo “SY-switch”. Este es el caso de la infección por EPEC que promueve la localización de cortactina en los pedestales de actina (Cantarelli, Takahashi *et al.* 2000) e induce la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina (Cantarelli, Kodama *et al.* 2007; Nieto-Pelegrin and Martínez-Quiles 2009). Mediante el uso de los mutantes miméticos de la fosforilación de cortactina se ha demostrado que la fosforilación de cortactina por Erk favorece la formación del pedestal, mientras que la fosforilación de cortactina por Src es dependiente de N-WASP y no promueve la formación de estas estructuras (Nieto-Pelegrin and Martínez-Quiles 2009).

Por el contrario, la infección por el patógeno gástrico *Helicobacter pylori* promueve la desfosforilación de cortactina en residuos de tirosina de manera dependiente del factor de virulencia CagA (*Cytotoxin-associated gene A*) (Selbach, Moese *et al.* 2003). Además en colaboración, la investigadora principal de nuestro grupo ha descubierto que la infección por *Helicobacter pylori* induce la fosforilación de cortactina en los residuos de serina 113 y 405 de forma independiente de CagA. Esta fosforilación en el residuo de serina 405 promueve la interacción de cortactina con la quinasa de adhesiones focales (FAK, *Focal Adhesion Kinase*) tras la infección por *Helicobacter pylori* (Tegtmeyer, Wittelsberger *et al.* 2011).

2.2.1 El sistema *Functional Interaction Trap*

El sistema *Functional Interaction Trap* (FIT) es una estrategia basada en la expresión de proteínas de fusión, que permite analizar la fosforilación en residuos de tirosina de un único sustrato en las células. Esta estrategia consiste en forzar la interacción de una proteína tirosina quinasa y un sustrato de elección a través de una interfaz de unión sintética altamente específica (Sharma, Antoku *et al.* 2003). Esta interfaz está formada por dos hélices superenrolladas ricas en residuos de leucina complementarias, denominadas

Zip (Zip proviene de la palabra inglesa *zipper*, cuya traducción es cremallera), que forman un motivo estructural denominado cremallera de leucinas (Arndt, Pelletier *et al.* 2000).

El FIT ha sido utilizado previamente para analizar las consecuencias funcionales de la fosforilación de la proteína p130Cas (*protein of 130-kDa Crk-associated substrate*) por la proteína tirosina quinasa Src (Sharma, Antoku *et al.* 2003; Sharma and Mayer 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, la tirosina quinasa Src también fosforila a cortactina de ratón en los residuos de tirosina 421, 466 y 482 (Huang, Liu *et al.* 1998). La proteína tirosina quinasa v-Src fue descubierta inicialmente como el producto transformante del Virus del Sarcoma de Rous (RSV) (Weiss, Varmus *et al.* 1977), el primer retrovirus oncogénico identificado (revisado en (Martin 2004)). El homólogo celular de esta proteína tirosina quinasa está codificado por el proto-oncogen celular *c-SRC* (*cellular Sarcoma*) (Shalloway, Zelenetz *et al.* 1981; Takeya and Hanafusa 1983).

La proteína tirosina quinasa Src pertenece a la familia Src de proteínas tirosina quinasas (SFKs, *Src Family of protein tyrosine Kinases*). La quinasa Src está agrupada en la subfamilia Src que también incluye a los miembros Yes (*v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1*), Fyn (*FYN oncogene related to SRC, FGR, YES*) y Fgr (*Feline gardner-rasheed sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog*) (revisado en (Ingley 2008)). Los miembros de la subfamilia Src son ubicuos, excepto Fgr que se expresa únicamente en algunos tipos celulares del sistema inmune.

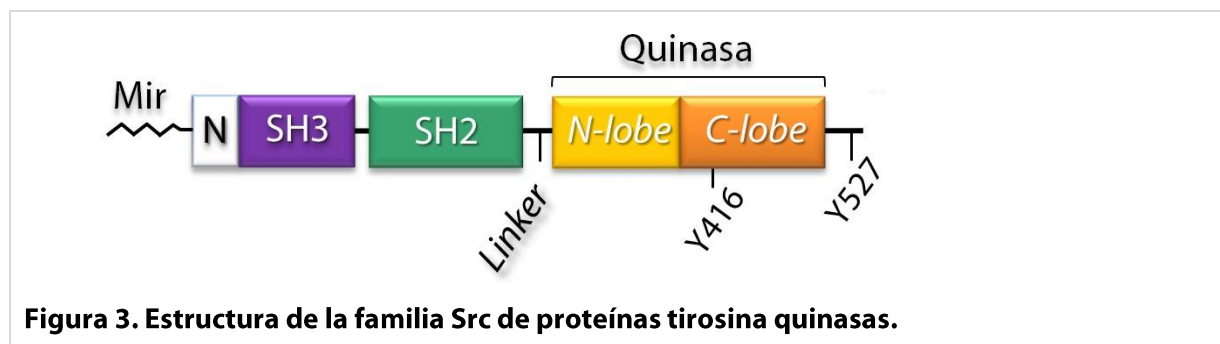


Figura 3. Estructura de la familia Src de proteínas tirosina quinasas.

Los miembros de la familia SFKs presentan una estructura organizada en dominios con una alta similitud de secuencia (Fig. 3). La tirosina quinasa Src contiene una secuencia señal de miristoilación en el extremo N-terminal que está implicada en la localización de la quinasa Src en la membrana plasmática, a continuación presenta un dominio único poco conservado en los miembros de la familia SFKs. Seguidamente posee un dominio SH3 que reconoce proteínas con motivos consenso ricos en residuos de prolina (Yu, Chen *et al.* 1994). Posteriormente contiene un dominio SH2 que reconoce motivos específicos con residuos de tirosina fosforilados (Songyang, Shoelson *et al.* 1993). A continuación, el dominio SH2 está conectado por una región de unión a un dominio tirosina quinasa.

Finalmente la quinasa Src presenta una cola corta C-terminal susceptible de ser fosforilada, que está implicada en la autorregulación de la proteína (revisado en (Engen, Wales *et al.* 2008)).

La proteína tirosina quinasa Src posee un estado de autoinhibición en el que los dominios SH2 y SH3 se pliegan en una conformación inactiva bloqueando el dominio tirosina quinasa (Xu, Harrison *et al.* 1997). Este estado inactivo es estabilizado por interacciones intramoleculares entre los dominios de interacción con proteínas y los segmentos polipeptídicos flexibles de la proteína (revisado en (Boggon and Eck 2004)).

La proteína tirosina quinasa Src empleada en el sistema FIT carece de los dominios SH3 y SH2 de unión a proteínas. Estos dominios han sido eliminados para forzar la interacción específica de la quinasa Src con el sustrato de interés a través de las hélices sintéticas complementarias ricas en residuos de leucina (Sharma, Antoku *et al.* 2003). Estudios previos han demostrado que la tirosina quinasa Src mantiene su actividad catalítica en ausencia de sus dominios SH3 y SH2 (Seidel-Dugan, Meyer *et al.* 1992; Sharma, Antoku *et al.* 2003). Además, se ha descrito que la función catalítica de la proteína tirosina quinasa Src es fundamental para la regulación del *spreading* y la migración celular (Cary, Klinghoffer *et al.* 2002).

Por lo expuesto anteriormente, se ha empleado el sistema FIT para analizar el efecto de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src.

2.3 Regulación de cortactina por acetilación/deacetilación

La acetilación del grupo ϵ -amino del residuo de lisina es una modificación post-traducciona reversible catalizada por las enzimas histona acetiltransferasas (HATs). Mientras que la eliminación de motivos acetyl del grupo ϵ -amino del residuo de lisina se denomina deacetilación y es catalizada por las histonas deacetilasas (HDACs) (revisado en (Sadoul, Wang *et al.* 2011)). Las HATs y las HDACs fueron descritas inicialmente en el núcleo celular catalizando la acetilación o deacetilación de proteínas histonas, de ahí su nombre. Hoy en día se sabe que muchas de estas enzimas también actúan sobre proteínas no histonas en el citoplasma de la célula (Kim, Sprung *et al.* 2006; Choudhary, Kumar *et al.* 2009).

En el trabajo de Zhang *et al.* 2007 se describe por primera vez que cortactina es susceptible de ser acetilada *in vitro* e *in vivo* en un total de 11 residuos de lisina situados principalmente en la zona de las repeticiones. En dicho estudio se indica que cortactina es sustrato de la acetiltransferasa PCAF (p300/CBP-Associated Factor) perteneciente a la familia de acetiltransferasas Gcn5 (General control non-derepressible 5)/PCAF. La

acetiltransferasa PCAF es capaz de acetilar *in vitro* a cortactina en 8 residuos de lisina localizados en la zona de las repeticiones (Zhang, Yuan *et al.* 2007).

Además, el trabajo de Zhang *et al.* 2007 demuestra que la histona deacetilasa 6 (HDAC6) es capaz de interaccionar con cortactina a través de la zona de las repeticiones y deacetilarla. Asimismo, la deacetilasa HDAC6 parece regular los niveles de acetilación de cortactina en residuos de lisina en la célula (Zhang, Yuan *et al.* 2007). La deacetilasa HDAC6 pertenece a la clase II de una superfamilia de proteínas HDACs conservadas evolutivamente (Leipe and Landsman 1997; Gregoret, Lee *et al.* 2004) que es inhibida por la acción del *Trichostatin A* (TSA) (Yoshida, Kijima *et al.* 1990).

Basándose en el modelado de la estructura tridimensional de cortactina, Zhang *et al.* 2007 proponen que los residuos de lisina localizados en la zona de las repeticiones de cortactina podrían estar agrupados formando dos “parches” de lisina con carga positiva, lo cual facilitaría la interacción de cortactina con actina-F. Mientras que la acetilación de dichas lisinas neutralizaría la carga de estos “parches” de lisina impidiendo la unión de actina-F. En concordancia con el modelado propuesto, la acetilación por la acetilasa PCAF en la zona de las repeticiones de cortactina inhibe la unión de actina-F *in vitro*. Asimismo, el mutante mimético de la acetilación de cortactina es incapaz de unir actina-F. Este mutante contiene sustituciones a residuos de glutamina en las 8 posiciones situadas en la zona de las repeticiones que son susceptibles de ser acetiladas *in vitro* y en otra de las posiciones que es susceptible de ser acetilada *in vivo*. Por el contrario, el mutante mimético de cortactina deacetilada, el cual contiene residuos de arginina en las 9 posiciones mencionadas anteriormente, es capaz de unir actina-F (Zhang, Yuan *et al.* 2007).

Además, el estado de acetilación/deacetilación de cortactina parece regular su localización dependiente de la GTPasa Rac en la célula. El mutante mimético de cortactina acetilada es incapaz de translocarse a la periferia de la célula de manera dependiente de Rac1, mientras que el mutante mimético de cortactina deacetilada mantiene esta capacidad. La expresión del mutante mimético de cortactina acetilada también provoca una disminución de la motilidad celular y de la velocidad de migración celular, probablemente debido a que cortactina acetilada no une actina-F en la zona de las repeticiones (Zhang, Yuan *et al.* 2007). Otro estudio ha demostrado que la expresión del mutante mimético de cortactina deacetilada en líneas celulares de cáncer de ovario y mama incrementa la motilidad celular, lo cual confirma el papel de esta modificación post-traducciona l de cortactina en la regulación de la migración celular (Zhang, Zhang *et al.* 2009).

Por otra parte, se ha descrito que HDAC6 forma un complejo con el represor transcripcional NACC1 (*Nucleus Accumbens-Associated 1*) que parece estar implicado en la regulación de los niveles de cortactina deacetilada y en la migración de células de melanoma (Tsunoda, Oikawa *et al.* 2011). Además, la deacetilasa HDAC6 es capaz de deacetilar a cortactina en células endoteliales regulando la migración celular y la angiogénesis (Kaluza, Kroll *et al.* 2011).

La deacetilasa Sirt1 (*Sirtuin 1*) también es capaz de interaccionar con cortactina a través de la zona de las repeticiones y deacetilarla. Sirt1 forma parte de la clase III de las HDACs, también conocida como la clase de sirtuinas. Las sirtuinas son inhibidas por la nicotinamida que es uno de los productos de la reacción de deacetilación de esta clase de deacetilasas. Además, cortactina puede ser acetilada en residuos de lisina por la histona acetiltransferasa p300 (proteínas de 300 kDa) perteneciente a la familia de HATs p300 /CBP (CREB, *cAMP response element-binding, binding protein*) (Zhang, Zhang *et al.* 2009). Asimismo, otro trabajo ha descrito que cortactina parece ser sustrato de la acetiltransferasa ATAT1 (*Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1*)/MEC-17 (*Mechanosensory-17*) perteneciente a la superfamilia de acetiltransferasas GNAT (*Gcn5-related N-acetyltransferase*) (Castro-Castro, Janke *et al.* 2012).

3. Papel de cortactina en el *spreading* celular y en las adhesiones focales

3.1 *Spreading* celular

El *spreading* celular consiste en la adherencia y expansión de la célula en una superficie bidimensional compuesta por proteínas de la matriz extracelular como la proteína fibronectina (Grinnell and Feld 1979). Este proceso ocurre en varias fases (Fig. 4) (Grinnell 1978; Wang and Goldman 1978). La célula en suspensión presenta una morfología esférica. Una vez la célula entra en contacto con la superficie bidimensional, las proteínas de la matriz extracelular son reconocidas por receptores de la célula tales como las integrinas, que son glicoproteínas implicadas en la adhesión celular (Tamkun, DeSimone *et al.* 1986).

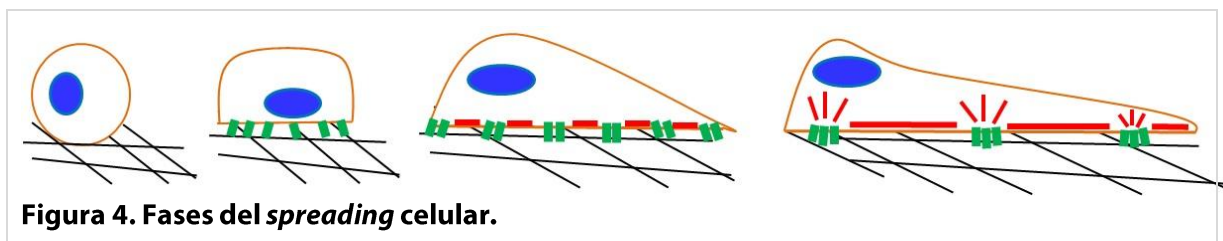
Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos formados por dos subunidades polipeptídicas denominadas cadena α y cadena β que están unidas de forma no covalente. Cada una de las cadenas posee un dominio extracelular extenso, un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta, estos dominios permiten conectar la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina. En los mamíferos han sido identificadas 24 integrinas formadas por la combinación de 18 cadenas α y 8 cadenas β (revisado en (Huttenlocher and Horwitz 2011)).

El dominio extracelular de las cadenas α y β de las integrinas está compuesto por un subdominio globular N-terminal situado sobre dos subdominios alargados en posición C-terminal. El subdominio extracelular globular de las integrinas reconoce motivos específicos en las proteínas de la matriz extracelular, lo cual determina la especificidad de la unión (revisado en (Huttenlocher and Horwitz 2011)).

La unión de un sustrato de la matriz extracelular al subdominio globular provoca un cambio conformacional del dominio extracelular de la integrina que pasa de una conformación curvada inactiva a una conformación extendida activa. Este cambio conformacional resulta en un aumento de la afinidad de la integrina por el sustrato, lo cual promueve la completa activación de las integrinas. Esta señalización se denomina *outside-in* y representa la señalización tradicional de los receptores.

Además, la afinidad de las integrinas por sus sustratos está regulada por la señalización intracelular desencadenada por varios estímulos externos (como factores de crecimiento o quimiocinas) reconocidos por otros receptores de la superficie celular. Esta señalización se denomina *inside-out* y también conduce a la activación de las integrinas (revisado en (Shattil, Kim *et al.* 2010)).

La activación de las integrinas conlleva la interacción de su dominio citoplasmático con activadores intracelulares como la proteína talina (Calderwood, Zent *et al.* 1999). La interacción de talina con el dominio citoplasmático de la cadena β de la integrina induce la separación de las cadenas α y β , lo cual promueve un cambio conformacional que provoca la completa activación de la integrina (Tadokoro, Shattil *et al.* 2003).



La activación de las integrinas provoca el agrupamiento (*clustering*) de estos receptores heterodiméricos, lo cual aumenta la avidéz del dominio extracelular por sus sustratos y favorece la interacción a través de la cola citoplasmática con numerosas proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina.

La adhesión celular mediada por integrinas conlleva un incremento de la superficie de contacto de la célula con la matriz extracelular dando lugar a protusiones de membrana de tipo *filopodia* y *lamellipodia*. La *filopodia* son protusiones alargadas formadas por agrupaciones de filamentos de actina en paralelo. Estas estructuras pueden preceder a la

formación de la *lamellipodia*. El acúmulo de proteínas asociadas al citoesqueleto en las zonas de contacto con la matriz extracelular favorece la formación de adhesiones nacientes en la *lamellipodia* que maduran en complejos focales y posteriormente en adhesiones focales (revisado en (Loosli, Luginbuehl *et al.* 2010)).

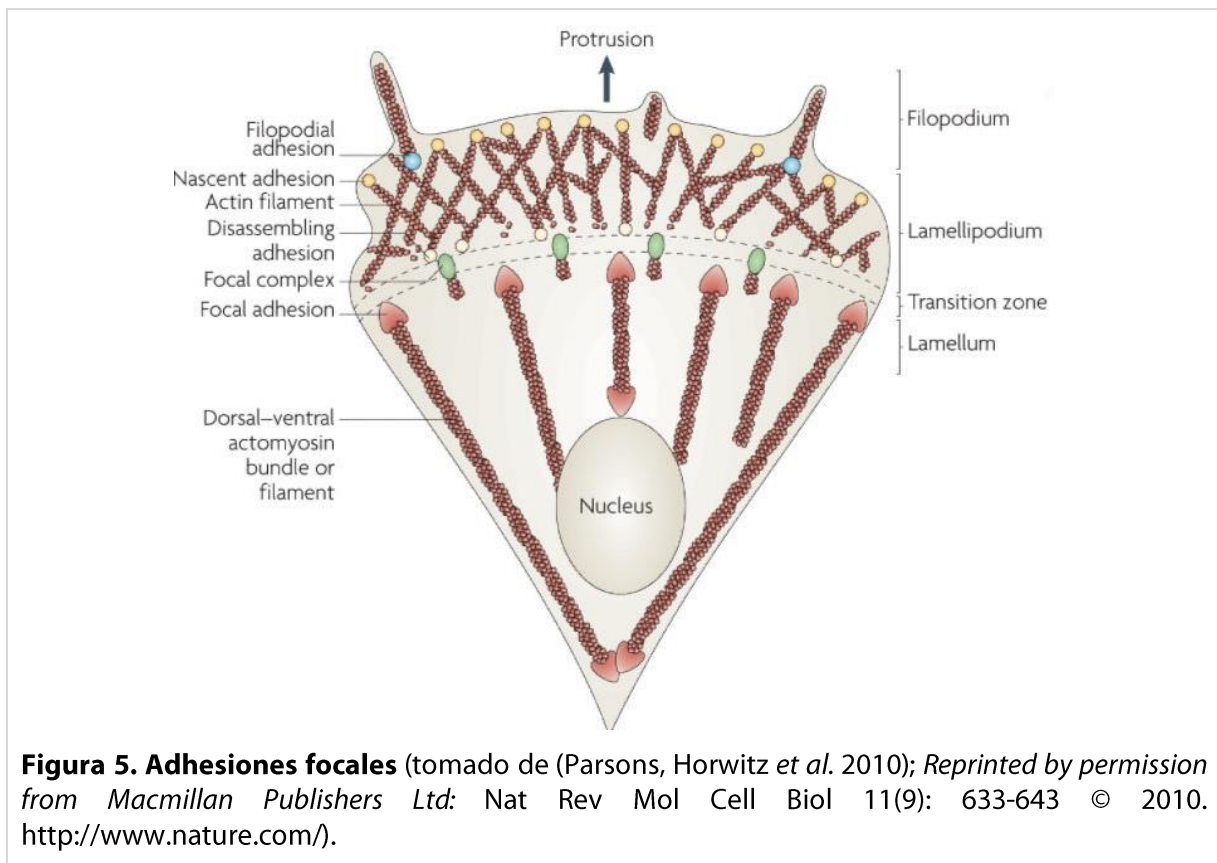
3.2 Adhesiones focales

La adhesión y migración celular sobre la matriz extracelular conlleva la formación de diferentes estructuras proteicas reguladas espacio-temporalmente. Estas estructuras adherentes se diferencian en tamaño, estabilidad y localización en la célula (Fig. 5) (revisado en (Parsons, Horwitz *et al.* 2010)).

Simultáneamente a la formación de la *lamellipodia* en el extremo de la célula se generan las adhesiones nacientes. Las adhesiones nacientes son de pequeño tamaño ($\sim 0,25 \mu\text{m}$) y tienen una vida media de aproximadamente un minuto. Las adhesiones nacientes pueden desensamblarse a medida que el borde de la célula avanza o madurar formando complejos focales que se localizan entre la *lamellipodia* y la lamela (zona situada entre el núcleo y la *lamellipodia*).

Los complejos focales son ligeramente mayores en tamaño ($\sim 0,5 \mu\text{m}$) que las adhesiones nacientes y tienen una vida media de varios minutos. Los complejos focales pueden desensamblarse o madurar hasta convertirse en adhesiones focales ($1\text{--}5 \mu\text{m}$) que tienen una vida media de $10\text{--}20$ minutos y se localizan al final de las fibras de estrés (estructuras compuestas por filamentos de actina agrupados, responsables de la tracción celular y reorganización de la matriz extracelular). Estas estructuras a su vez pueden desensamblarse o pueden madurar hasta convertirse en adhesiones fibrilares ($>5 \mu\text{m}$), que son estructuras más estables implicadas en la reorganización de la matriz extracelular (revisado en (Gardel, Schneider *et al.* 2010)).

Aunque la composición proteica de estas adhesiones es similar, su maduración supone un acúmulo de diversas proteínas asociadas al citoesqueleto. Las adhesiones focales están compuestas por la agrupación de integrinas, de proteínas estructurales y de complejos proteicos de señalización en las zonas de contacto de la célula con la matriz extracelular (revisado en (Geiger, Bershadsky *et al.* 2001)). Se han descrito numerosas proteínas asociadas a estas estructuras entre las que destacan proteínas de unión a actina como talina o vinculina, proteínas tirosina quinasas implicadas en la señalización intracelular como Src y FAK y proteínas adaptadoras como paxilina o p130Cas, entre otras (revisado en (Huttenlocher and Horwitz 2011)).



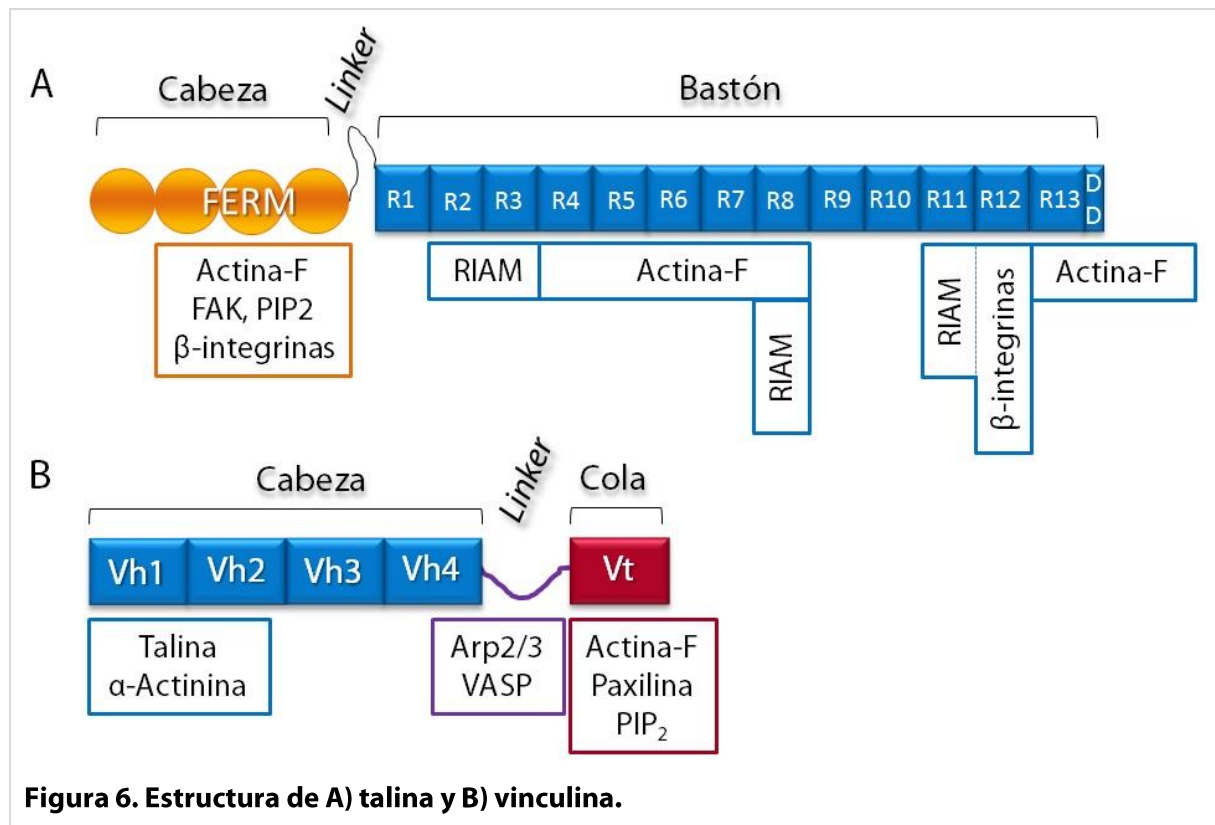
La proteína talina es esencial para la formación de las adhesiones focales (Zhang, Jiang *et al.* 2008). Esta proteína está compuesta por una región globular o “cabeza” N-terminal que contiene un dominio FERM (*4.1 protein, Ezrin, Radixin, Moesin domain*) atípico y un “bastón” C-terminal compuesto por 62 hélices alfa anfipáticas organizadas en 13 paquetes de 4 o 5 hélices (Fig. 6) (revisado en (Calderwood, Campbell *et al.* 2013)). El dominio FERM de talina está unido a través de una región no estructurada al bastón de talina. Asimismo, talina presenta una hélice simple en el extremo carboxilo terminal que contribuye a la dimerización de la proteína. Talina puede estar en conformación cerrada y autoinhibida o en conformación extendida y activa.

La cabeza de talina interacciona con la cola citoplasmática de la subunidad β de las integrinas promoviendo la activación y el agrupamiento de estos receptores en la zona de contacto con la matriz extracelular (Calderwood, Yan *et al.* 2002; Cluzel, Saltel *et al.* 2005). Por otro lado, el bastón de talina contiene 11 sitios potenciales de unión a vinculina (del Rio, Perez-Jimenez *et al.* 2009). En el bastón de talina también existen varios sitios de unión a RIAM (*RAP1-GTP-Interacting Adaptor Molecule*). RIAM es una proteína adaptadora capaz de interaccionar con la GTPasa pequeña Rap1 regulando la dinámica de actina (Lafuente, van Puijenbroek *et al.* 2004). RIAM está implicada en promover la localización de talina en la membrana, lo cual es necesario para la activación de las integrinas (Lee, Lim *et al.* 2009).

Además, el bastón de talina presenta un sitio adicional de unión a integrinas (Gingras, Ziegler *et al.* 2009) y al menos dos sitios de unión a actina (Hemmings, Rees *et al.* 1996).

Vinculina es una de las proteínas que se acumula en las adhesiones focales (Geiger 1979). Vinculina es una proteína adaptadora compuesta por una cabeza, un cuello flexible rico en residuos de prolina y una cola, por los cuales es capaz de interactuar con numerosas proteínas (revisado en (Carisey and Ballestrem 2011)). Las interacciones intramoleculares entre la cabeza y la cola de vinculina bloquean la unión a proteínas (Johnson and Craig 1994). En la conformación extendida, la cabeza de vinculina es capaz de interactuar con el bastón de talina (Burridge and Mangeat 1984; Bass, Patel *et al.* 2002). Además, la localización de vinculina en las adhesiones focales requiere de la presencia de talina (Wang, Ballestrem *et al.* 2011). Por otra parte, la cola de vinculina presenta al menos dos sitios de unión a filamentos de actina (Huttelmaier, Bubeck *et al.* 1997).

Las proteínas adaptadoras vinculina y RIAM compiten por la unión a talina regulando la dinámica de las adhesiones focales. La interacción de RIAM con talina está implicada en la activación de las integrinas. Mientras que la interacción de vinculina con talina está implicada en la maduración de las adhesiones focales e inhibe la unión de RIAM a la región N-terminal del bastón de talina (Goult, Zacharchenko *et al.* 2013).



Talina es una de las principales proteínas implicadas en la formación de las adhesiones nacientes debido a su capacidad de conectar las integrinas con vinculina y con los filamentos de actina. La interacción de vinculina con talina contribuye a la estabilidad de las adhesiones focales (Humphries *et al.*, 2007). Además, vinculina a través de su interacción con talina transmite las señales mecánicas entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina durante la dinámica de las adhesiones focales y regula la composición proteica de estas estructuras (Carisey, Tsang *et al.* 2013).

Talina también es capaz de interaccionar con la proteína tirosina quinasa citoplasmática FAK, lo cual promueve la activación de FAK (Chen, Appeddu *et al.* 1995). La quinasa FAK está implicada en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales y la motilidad celular (revisado en (Zhao and Guan 2011)). Un estudio empleando células en las que se había eliminado la expresión de talina, indica que talina es esencial para la localización de la quinasa FAK activada en las adhesiones focales (Zhang, Jiang *et al.* 2008). Sin embargo, otro estudio sugiere que la quinasa FAK parece ser crucial para la localización de la proteína talina en las adhesiones nacientes (Lawson, Lim *et al.* 2012).

La proteína tirosina quinasa FAK está compuesta por un dominio FERM en posición N-terminal, seguido de un dominio catalítico, una región no estructurada con dos dominios ricos en residuos de prolina y un dominio FAT (*Focal Adhesion Targeting*) en el extremo C-terminal, el cual es necesario para localización de FAK en las adhesiones focales (Hildebrand, Schaller *et al.* 1993). La adhesión mediada por integrinas promueve la autofosforilación en el residuo Y397 de FAK (Sieg, Hauck *et al.* 2000). Este residuo fosforilado es reconocido por el dominio SH2 de Src, lo cual conduce a la formación del complejo FAK-Src (Schaller, Hildebrand *et al.* 1994). La proteína tirosina quinasa Src fosforila a FAK en otros residuos de tirosina favoreciendo su completa activación (Calalb, Polte *et al.* 1995). Además, FAK interacciona con diversas proteínas, como p130Cas, en las adhesiones focales (Polte and Hanks 1995), donde son fosforiladas por el complejo FAK-Src (revisado en (Zhao and Guan 2011)).

Varios estudios han demostrado que cortactina afecta al *spreading* celular, aunque su función en la regulación de este proceso estaba pendiente de determinar. La inhibición de cortactina en la línea de células humanas de fibrosarcoma HT1080 parece retrasar la formación de adhesiones nacientes y de la *lamellipodia* (Bryce, Clark *et al.* 2005). Sin embargo, la inhibición estable de la expresión de cortactina en la línea celular HBL-100 (línea celular epitelial derivada de células primarias obtenidas de leche humana) acelera el *spreading* celular sobre fibronectina y no parece afectar al número o integridad de las adhesiones focales (van Rossum, Moolenaar *et al.* 2006).

Otro estudio ha revelado que la sobreexpresión del dominio N-terminal o C-terminal de cortactina inhibe el *spreading* sobre fibronectina en la línea celular COS7 (línea celular derivada de riñón de mono verde africano). Sin embargo, la sobreexpresión del dominio C-terminal de cortactina con una mutación en el dominio SH3 que bloquea la unión de proteínas ricas en residuos de prolina no parece inhibir el *spreading* celular. Mientras que la inhibición de la expresión de cortactina en las células COS7 impide el *spreading* celular (Illes, Enyedi *et al.* 2006). Además, otro estudio ha descrito que cortactina parece promover el *spreading* de los conos de crecimiento de las neuronas del hipocampo (Kurklinsky, Chen *et al.* 2011).

Por otra parte, cortactina endógena fosforilada en residuos de tirosina se localiza en las adhesiones focales (Jia, Uekita *et al.* 2008; Wang, Chen *et al.* 2008; Wang, Liu *et al.* 2011). La sobreexpresión de los mutantes miméticos de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina o de serina promueve la formación de la *lamellipodia* e induce la migración celular. Además, la sobreexpresión del mutante mimético de la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina incrementa la dinámica de las adhesiones focales, así como el desensamblaje de las fibras de estrés (Kruchten, Krueger *et al.* 2008), lo cual está en concordancia con el modelo *S-Y switch* basado en el estudio *in vitro* de los mutantes miméticos de la fosforilación de cortactina (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004).

4. Proteínas adaptadoras Crk

El oncogen *v-crk* (*Viral-CT10 (Chicken Tumor virus 10) Regulator of Kinase*) que codifica para la proteína v-Crk fue aislado inicialmente del retrovirus del sarcoma aviar CT10 (Mayer, Hamaguchi *et al.* 1988b). Las proteínas homólogas celulares de v-Crk están codificadas por los genes *CRK* (Reichman, Mayer *et al.* 1992) y *CRKL* (*Crk-Like*) (ten Hoeve, Morris *et al.* 1993).

El procesamiento alternativo del gen *CRK* da lugar a las isoformas CrkI y CrkII (Matsuda, Tanaka *et al.* 1992). El gen *CRK* está localizado en la región cromosómica 17p13 (Fioretos, Heisterkamp *et al.* 1993), delecionada en el síndrome de Miller-Dieker (Tenney, Hopkin *et al.* 2011). El gen *CRKL* codifica para la proteína paróloga CrkL (ten Hoeve, Morris *et al.* 1993). El gen *CRKL* se localiza en la región cromosómica 22q11, frecuentemente delecionada en pacientes con el síndrome DiGeorge/velocardiofacial (Guris, Fantes *et al.* 2001). Las isoformas CrkI, CrkII y CrkL componen la familia de proteínas adaptadoras Crk y presentan una expresión ubicua. Además en un único trabajo se ha identificado una tercera variante codificada por el gen *CRK*, la isoforma CrkIII (Prosser, Sorokina *et al.* 2003).

Las isoformas CrkII y CrkL presentan funciones redundantes en diversas rutas (revisado en (Birge, Kalodimos *et al.* 2009)). Sin embargo, los ratones *knockout* de los genes que codifican para CrkI/II (Park, Boyd *et al.* 2006) y para CrkL (Guris, Fantes *et al.* 2001) presentan letalidad embrionaria, lo cual indica que estas proteínas parecen tener funciones distintas durante el desarrollo embrionario. Además, CrkII y CrkL muestran diferente afinidad por la oncoproteína Bcr (*Breakpoint cluster region*)-Abl, lo cual sugiere que podrían tener funciones específicas en determinadas rutas (Jankowski, Saleh *et al.* 2012), comentado en (Kobashigawa and Inagaki 2012)).

4.1 Estructura y función de la familia de las proteínas adaptadoras Crk

En la revisión de Matsuda *et al.* 1996 se destaca el papel de Crk como la primera proteína adaptadora identificada (revisado en (Matsuda and Kurata 1996)). Los adaptadores Crk son proteínas modulares que carecen de actividad catalítica y están compuestas por un dominio SH2 y uno o dos dominios SH3 (Fig. 7). La proteína de origen viral v-Crk y el homólogo celular CrkI poseen únicamente un dominio SH3. Mientras que las isoformas CrkII y CrkL presentan dos dominios SH3, uno en posición N-terminal (nSH3) y otro en posición C-terminal (cSH3), separados por una región de unión. Las isoformas CrkII y CrkL poseen un alto grado de similitud en sus secuencias peptídicas, principalmente en los dominios de unión a proteínas (un 56% de identidad en la secuencia completa, un 82% de identidad en la secuencia del dominio SH2, un 70% en el dominio nSH3 y un 68% en el dominio cSH3) (ten Hoeve, Morris *et al.* 1993; Jankowski, Saleh *et al.* 2012).

El dominio SH2 reconoce e interacciona con proteínas fosforiladas en residuos de tirosina a través de secuencias peptídicas específicas (pTyr-X-X-Pro/Leu, X representa cualquier aminoácido) (Songyang, Shoelson *et al.* 1993; Liu, Jablonowski *et al.* 2010). Además, el dominio SH2 presente en CrkI y CrkII posee una secuencia de 17 aminoácidos adicionales enriquecida en residuos de prolina, capaz de unir el dominio SH3 de la quinasa Abl (Anafi, Rosen *et al.* 1996).

Por otra parte, el dominio nSH3 reconoce e interacciona con secuencias consenso PRRs, ricas en residuos de prolina (Pro-x-x-Pro-x-Lys/Arg) (Knudsen, Feller *et al.* 1994). Estudios estructurales han demostrado que el dominio cSH3 presenta la estructura y el plegamiento característicos de los dominios SH3 (revisado en (Sriram and Birge 2012)). Sin embargo, el dominio cSH3 no reconoce las secuencias consenso PRRs clásicas (Muralidharan, Dutta *et al.* 2006; Jankowski, Saleh *et al.* 2012). Esto se debe a que este dominio contiene varios residuos polares en la superficie de unión a proteínas, a diferencia de los dominios SH3 convencionales que presentan residuos aromáticos (Muralidharan,

Dutta *et al.* 2006). Además, se ha descrito que el dominio cSH3 parece funcionar como un elemento regulatorio en la estructura de CrkII (Kobashigawa, Sakai *et al.* 2007).

La familia de proteínas adaptadoras Crk participa en la transducción de señales intracelulares provenientes de diversos estímulos como citocinas, factores de crecimiento, la adhesión celular mediada por integrinas o la infección por determinados patógenos. Por ello esta familia de proteínas adaptadoras está implicada en múltiples procesos como proliferación celular, adhesión celular, motilidad celular, fagocitosis y apoptosis (revisado en (Birge, Kalodimos *et al.* 2009)). Además, varios estudios sugieren que las proteínas adaptadoras Crk están sobreexpresadas en diversos tipos de cáncer y que sus niveles de expresión están asociados a la agresividad tumoral (revisado en (Sriram and Birge 2010; Bell and Park 2012)).

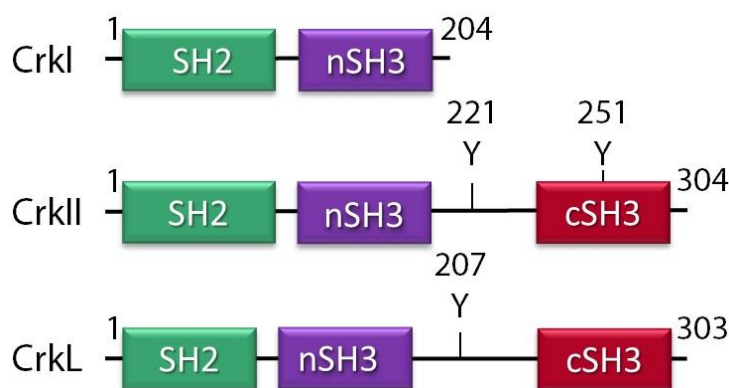


Figura 7. Estructura de las isoformas celulares de la familia de proteínas adaptadoras Crk.

La proteína v-Crk fue identificada inicialmente por su capacidad de inducir transformación en fibroblastos. Además, la sobreexpresión de v-Crk aumenta la fosforilación en residuos de tirosina de determinados sustratos, a pesar de carecer de actividad tirosina quinasa (Mayer, Hamaguchi *et al.* 1988a; Mayer, Hamaguchi *et al.* 1988b). Esto probablemente se debe a que las proteínas adaptadoras Crk parecen estar implicadas en la regulación de la actividad de varias proteínas tirosina quinasas como Abl (Sriram, Reichman *et al.* 2011), Src (Sabe, Shoelson *et al.* 1995) o FAK (Iwahara, Akagi *et al.* 2004).

Otra de las funciones principales de las proteínas adaptadoras Crk en la transducción de señales es la formación de complejos proteicos. Las proteínas adaptadoras Crk son capaces de unir sustratos fosforilados en residuos de tirosina a través de su dominio SH2. La proteína p130Cas y paxilina son los sustratos mejor caracterizados del dominio SH2 de las proteínas Crk, ambos están implicados en la señalización de las integrinas, como se ha comentado anteriormente. Por otro lado, el dominio nSH3 presente en CrkII y CrkL es capaz de unir diversos factores intercambiadores del nucleótido de guanina (GEFs, *Guanine*

Nucleotide Exchange Factors) contribuyendo a la activación de distintas GTPasas implicadas en el remodelado del citoesqueleto de actina. Asimismo, el dominio nSH3 de las proteínas Crk reconoce e interacciona con el motivo PRR de proteínas tirosina quinasas como Abl o Arg implicadas en la fosforilación de estas proteínas adaptadoras (revisado en (Bell and Park 2012)).

4.2 Regulación de las proteínas adaptadoras Crk

La proteína v-Crk es considerada un oncogen, asimismo las proteínas celulares de la familia Crk parecen estar sobreexpresadas en varios tipos de cáncer (revisado en (Bell and Park 2012)). La sobreexpresión de cualquiera de las isoformas de la familia Crk es suficiente para inducir la transformación en fibroblastos (Matsuda, Tanaka *et al.* 1992; Senechal, Halpern *et al.* 1996; Iwahara, Akagi *et al.* 2003). Sin embargo, CrkI presenta una mayor capacidad transformante en fibroblastos que el resto de las proteínas de esta familia, promoviendo elevados niveles de fosforilación en residuos de tirosina e induciendo la tumorigénesis (Matsuda, Tanaka *et al.* 1992). Las diferencias en la capacidad transformadora de las isoformas de la familia Crk se atribuyen a que CrkI no parece presentar mecanismos de autorregulación, a diferencia de CrkII y CrkL.

Las isoformas CrkII y CrkL presentan una elevada similitud en sus secuencias peptídicas, como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo estas dos isoformas presentan varias diferencias estructurales, así como distintos mecanismos de regulación, lo cual podría explicar que CrkL presente una mayor capacidad oncogénica que CrkII (Matsuda, Tanaka *et al.* 1992; Jankowski, Saleh *et al.* 2012).

4.2.1 Regulación de las proteínas adaptadoras Crk por fosforilación

Las isoformas CrkII y CrkL contienen un residuo de tirosina susceptible de ser fosforilado, situado en la región de unión del dominio nSH3 y el dominio cSH3. Este residuo de tirosina se encuentra en la posición 221 en CrkII y en la posición 207 en CrkL. Las proteínas tirosina quinasas Abl y Arg son las principales responsables de la fosforilación en estos residuos de tirosina (Feller, Knudsen *et al.* 1994; Ren, Ye *et al.* 1994; de Jong, ten Hoeve *et al.* 1997).

La fosforilación en el residuo de tirosina 221 en CrkII y 207 en CrkL promueve la interacción con el dominio SH2 de la propia molécula. Esta interacción intramolecular impediría la unión de otras proteínas fosforiladas en residuos de tirosina al dominio SH2 de CrkII y de CrkL (Feller, Knudsen *et al.* 1994; Rosen, Yamazaki *et al.* 1995; Jankowski, Saleh *et al.* 2012). Por tanto, la fosforilación del residuo de tirosina localizado en la región de unión

de los dominios nSH3 y cSH3 regula la interacción con otras proteínas a través del dominio SH2.

La proteína CrkII presenta una estructura compacta estabilizada por interacciones intramoleculares de los dominios de unión a proteínas con la región de unión de los dominios nSH3 y cSH3. El dominio nSH3 de CrkII se encuentra parcialmente bloqueado por el dominio SH2 en su forma no fosforilada. Mientras que el dominio SH2 de la isoforma CrkII no fosforilada estaría accesible para interactuar con proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. La fosforilación en el residuo de tirosina 221 en CrkII bloquea totalmente la unión de proteínas a través del dominio nSH3 (Kobashigawa, Sakai *et al.* 2007). Además, el dominio cSH3 de CrkII es capaz de unirse a los dominios SH2 y nSH3 contribuyendo a la estabilización de la conformación autoinhibida (revisado en (Liu 2014)).

Por el contrario, el dominio nSH3 de la isoforma CrkL está accesible para interactuar con proteínas que presentan PRRs, independientemente de su estado de fosforilación. Mientras que el dominio SH2 se encuentra parcialmente oculto por el dominio nSH3. Además, el dominio cSH3 de CrkL no presenta una función regulatoria, ya que no interactúa con los dominios SH2 y nSH3 (Jankowski, Saleh *et al.* 2012).

Por tanto, la fosforilación de CrkII impide la unión a proteínas a través de sus dominios SH2 y nSH3, mientras que CrkL fosforilado es capaz de unir proteínas a través de su dominio nSH3. Estas diferencias estructurales en CrkII y CrkL explican la afinidad preferencial de CrkL por determinados sustratos y que estas isoformas presenten funciones específicas en determinados contextos (Jankowski, Saleh *et al.* 2012).

CrkL es el principal sustrato de la oncoproteína Bcr-Abl (Colicelli 2010), la cual está codificada por el gen híbrido *BCR-ABL* originado por una translocación cromosómica recíproca. Esta oncoproteína presenta actividad quinasa constitutiva y es la principal responsable de la leucemia mieloide crónica (CML, *Chronic myeloid leukaemia*) (revisado en (Cilloni and Saglio 2012)). La proteína de fusión Bcr-Abl interactúa con el dominio nSH3 de CrkL y fosforila a esta proteína en el residuo de tirosina regulatorio (Senechal, Halpern *et al.* 1996). Un estudio ha demostrado que la isoforma CrkL es capaz de interactuar con Bcr-Abl con la misma afinidad en su estado fosforilado que en su estado sin fosforilar, a diferencia de CrkII (Kobashigawa, Sakai *et al.* 2007; Jankowski, Saleh *et al.* 2012).

Por otro lado, un único estudio ha descrito que el residuo de tirosina 251 situado en el dominio cSH3 de CrkII también es susceptible de ser fosforilado por la proteína tirosina quinasa Abl *in vitro* e *in vivo*. El residuo de tirosina 251 fosforilado de CrkII es capaz de interactuar con el dominio SH2 de la tirosina quinasa Abl (Sriram, Reichman *et al.* 2011).

Además, el residuo de tirosina 251 de CrkII forma parte del motivo aminoacídico PNAY y su fosforilación parece promover la transactivación de Abl (Reichman, Singh *et al.* 2005; Sriram, Reichman *et al.* 2011). Por tanto, la fosforilación del dominio cSH3 podría actuar como un regulador positivo activando a la proteína tirosina quinasa Abl.

4.2.2. Otros mecanismos de regulación de las proteínas adaptadoras Crk

La isoforma CrkII de pollo parece estar regulada también por un mecanismo de isomerización en *cis-trans* en el residuo de prolina 238. El residuo de prolina 238 está situado en la región de unión de los dominios nSH3 y cSH3. La conformación en *cis* del residuo de prolina 238 promueve la unión de los dominios nSH3 y cSH3, dando lugar a una conformación autoinhibida. Por el contrario, la conformación en *trans* del residuo de prolina 238 favorece una conformación extendida permitiendo que el dominio nSH3 interactúe con proteínas que presentan PRRs. Este proceso puede ser catalizado por peptidil-prolil isomerasas como la ciclofilina A (Sarkar, Reichman *et al.* 2007; Sarkar, Saleh *et al.* 2011).

En homología a CrkII de pollo, la isoforma CrkII de humano presenta un residuo de prolina en la posición 237. Sin embargo, la secuencia alrededor del residuo de prolina 237 de la isoforma CrkII de humano difiere con respecto a la secuencia de pollo, por lo que este mecanismo podría no estar conservado entre especies (revisado en (Sriram and Birge 2012)).

4.3 Papel de las proteínas adaptadoras Crk en la patogénesis bacteriana

Las proteínas adaptadoras Crk están implicadas en la infección por diversos patógenos, entre los que se incluyen varias enterobacterias (Martinez-Quiles, Feuerbacher *et al.* 2014).

La infección por *Listeria monocytogenes* también promueve la interacción de CrkII con la proteína adaptadora Gab1 (*Grb2-associated binder-1*), la cual es necesaria para la internalización de este bacilo Gram-positivo (Sun, Shen *et al.* 2005). Asimismo, recientemente se ha descrito que la infección por *Chlamydia trachomatis* induce la interacción de la proteína bacteriana TepP (*Translocated early Phosphoprotein*) con CrkI/II. La proteína TepP es fosforilada en residuos de tirosina por las proteínas tirosina quinasas celulares durante la infección por *Chlamydia trachomatis* y es necesaria para la co-localización de CrkII con la bacteria durante la infección (Chen, Bastidas *et al.* 2014).

Además, numerosos trabajos han demostrado que la fosforilación de las proteínas adaptadoras Crk es inducida durante la infección por distintos patógenos bacterianos

como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*). *S. Typhimurium* se adhiere a la superficie de la célula y promueve la formación de extensiones de tipo *lamellipodia* que favorecen la internalización de la bacteria en vacuolas (revisado en (Garai, Gnanadhas *et al.* 2012)). Crkl/II se localiza en la zona de invasión de *S. Typhimurium* (Boyle, Brown *et al.* 2007). La invasión por este bacilo Gram-negativo induce la fosforilación de CrkII mediada por la proteína tirosina quinasa Abl, lo cual facilita la invasión (Ly and Casanova 2009).

Por otra parte, las proteínas adaptadoras Crk son diana de distintas toxinas bacterianas. La citotoxina ExoT de *Pseudomonas aeruginosa* tiene actividad ADP-ribosil transferasa y es capaz de actuar sobre los adaptadores CrkI y CrkII (Sun and Barbieri 2003). La ribosilación de ADP por ExoT en el residuo de arginina 20 situado en el dominio SH2 de Crk impide su interacción con p130Cas y paxilina (Deng, Sun *et al.* 2005). Además, ExoT es capaz de bloquear la fagocitosis en células epiteliales polarizadas y macrófagos, así como de promover la despolimerización de actina (Garritty-Ryan, Kazmierczak *et al.* 2000).

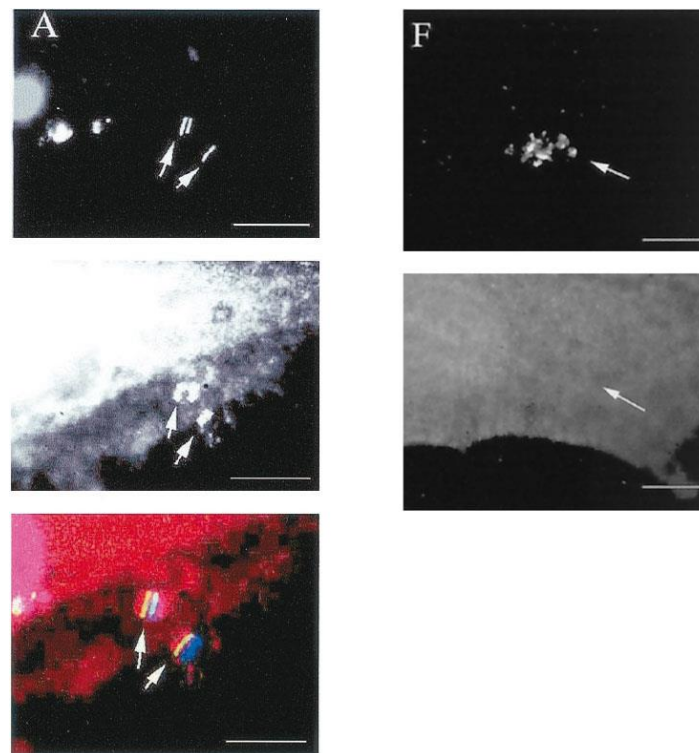


Figura 8. Localización de CrkII en los pedestales de actina formados por la infección con *Escherichia coli* enteropatógena (Reproduced with permission from American Society for Microbiology Infect Immun 69(5): 3315-3322 © 2001. <http://iai.asm.org/>); FIG. 1. (A) and FIG. 3. (F) (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). **A)** Células HeLa infectadas por EPEC. **F)** Células HeLa infectadas con una cepa de EPEC que expresa un mutante de Tir no fosforilable en el residuo de tirosina 474 (EPEC Δ tir/tirY474F). Los paneles superiores muestran la localización de Tir mediante inmunofluorescencia, mientras que los paneles inferiores muestran la localización de CrkII. La barra representa 5 μ m.

Un único trabajo había descrito mediante inmunofluorescencia que CrkII se localiza en los pedestales de actina formados tras la infección por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). En el mismo trabajo se muestra que la proteína CrkII no se localiza en los pedestales en células infectadas con una cepa de EPEC que expresa un mutante no fosforilable de la proteína bacteriana Tir (*Translocated intimin receptor*), el cual contiene una sustitución en el residuo de tirosina 474 a fenilalanina (Y474F) (Fig. 8) (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). La cepa de EPEC que expresa Tir con la mutación Y474F prácticamente no forma pedestales (Kenny 1999). Estos resultados sugieren que la proteína adaptadora CrkII podría estar implicada en la formación de los pedestales de actina por EPEC. Sin embargo, la función de las proteínas Crk en estas estructuras no se conocía. Por ello, nuestro grupo decidió analizar el papel de las proteínas adaptadoras de la familia Crk en la formación de pedestales de actina por EPEC. En la Tesis de Elvira Nieto Pelegrín, anterior doctoranda de nuestro grupo, se demostró que la eliminación simultánea de todas las isoformas de la familia Crk provoca un aumento significativo en el número de pedestales, lo cual sugería que las proteínas adaptadoras Crk podrían actuar de manera redundante inhibiendo la formación de estas estructuras. En la presente tesis doctoral se ha estudiado el mecanismo molecular que explicaría dicho hallazgo.

5. Formación de pedestales de actina por EPEC

Escherichia coli enteropatógena es un patovar (cepa o grupo de cepas de una especie que se define por tener un perfil patogénico común) de la bacteria entérica Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*). EPEC coloniza principalmente el intestino delgado en cultivos *in vitro* de intestino humano (Phillips, Navabpour *et al.* 2000). Este microorganismo es miembro de una familia de bacterias patógenas extracelulares no invasivas denominadas *Attaching and Effacing* (A/E) que causan diarrea e inducen la formación de lesiones histopatológicas denominadas A/E en los enterocitos (revisado en (Lai, Rosenshine *et al.* 2013)).

Las lesiones A/E se caracterizan por el acúmulo de filamentos de actina bajo la bacteria adherida formando unas estructuras denominadas pedestales (Fig. 10) ((Knutton, Baldwin *et al.* 1989); (revisado en (Wong, Pearson *et al.* 2011). Además, en las lesiones A/E se observa una pérdida localizada de las microvellosidades intestinales debido a la adherencia íntima de la bacteria a la membrana de la célula epitelial.

EPEC induce la formación de los pedestales de actina desde una posición extracelular. Asimismo, en estas estructuras se localizan numerosas proteínas relacionadas con remodelación del citoesqueleto de actina, entre las que se incluye la proteína adaptadora CrkII (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Por ello esta bacteria es comúnmente utilizada para

estudiar la señalización del citoesqueleto de actina (revisado en (Hayward, Leong *et al.* 2006)).

La familia de bacterias patógenas A/E incluye al patógeno de humano *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, *Enterohemorrhagic E. coli*) y a otros patógenos de animales como el patógeno de ratón *Citrobacter rodentium* (CR) y *E. coli* enteropatógena de conejo (REPEC, *Rabbit Enteropathogenic E. coli*). La infección de ratones con CR se ha empleado en numerosos trabajos como modelo *in vivo* de la infección por EPEC en humanos (Higgins, Frankel *et al.* 1999; Deng, Vallance *et al.* 2003).

La primera cepa de EPEC fue aislada durante las investigaciones de un brote de diarrea infantil ocurrido en la década de los 40 en Inglaterra (revisado en (Lai, Rosenshine *et al.* 2013)). EPEC es transmitido por vía oral-fecal y actualmente continúa siendo una causa importante de mortalidad infantil en los países en vías de desarrollo, con una prevalencia entre el 2,4% y el 18,2% de los casos de diarrea en niños menores de 10 años (Ochoa, Barletta *et al.* 2008). Además, varios patovares de *E. coli* son considerados patógenos emergentes en los países desarrollados, un ejemplo de ello es el brote producido en Alemania en 2011 por el patovar de *E. coli* STEAEC (*Shiga toxin-producing Enteroaggregative E. coli*) (revisado en (Clements, Young *et al.* 2012)).

5.1 Factores de patogenicidad

El serotipo de EPEC O127:H6 (O, indica el antígeno O que forma parte de los lipopolisacáridos de la membrana externa y H, hace referencia a la presencia de antígeno flagelar) cepa E2348/69 es la cepa prototipo de EPEC usada en la mayor parte de las investigaciones (Levine, Bergquist *et al.* 1978) y la empleada en la presente tesis doctoral. Esta cepa de EPEC presenta una isla de patogenicidad (agrupación de genes de virulencia) cromosómica de 35 Kb denominada locus de eliminación del enterocito (LEE, *Locus of Enterocyte Effacement*), en la cual se localizan la mayoría de los genes necesarios para causar las lesiones A/E.

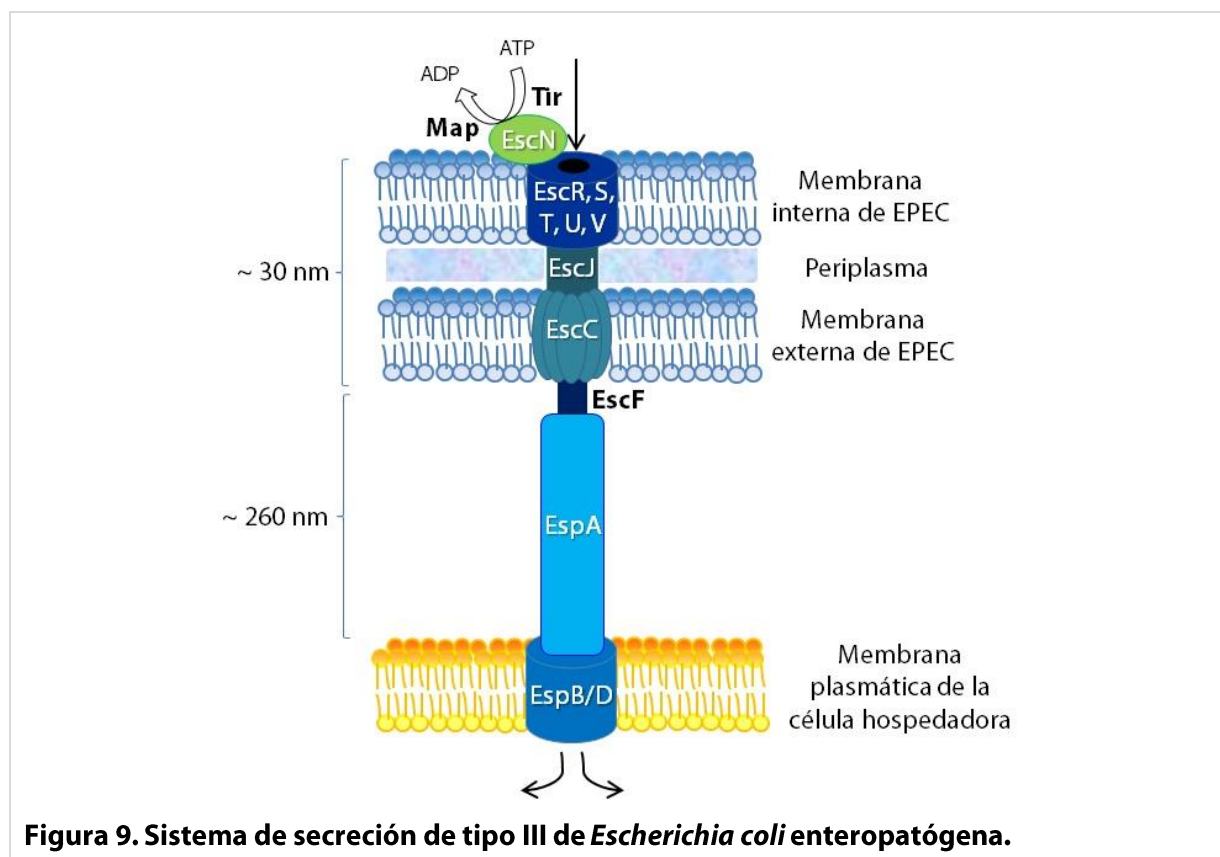
LEE está compuesto por 41 genes, la mayoría de los cuales están organizados en 5 operones. La organización general y el contenido de genes del locus LEE está altamente conservado en los patógenos A/E (McDaniel, Jarvis *et al.* 1995). LEE contiene genes que codifican para reguladores transcripcionales, chaperonas, proteínas estructurales del sistema de secreción de tipo III (TTSS, *Type Three Secretion System*), la adhesina intimina y proteínas secretadas denominadas efectores, entre las que se incluye el receptor translocado de intimina, Tir (McDaniel and Kaper 1997).

Además, las cepas típicas de EPEC presentan un plásmido denominado EAF (*EPEC Adherence Factor*). El plásmido EAF codifica para una adhesina fimbrial o pili conocida como BFP (*Bundle-Forming Pili*) que está implicada en la adherencia inicial de EPEC a la superficie del epitelio. El BFP participa en la formación de microcolonias a través de interacciones bacteria-bacteria, dando lugar a un patrón conocido como “adherencia localizada”. Las cepas de EPEC que carecen de este plásmido se denominan atípicas (revisado en (Humphries and Armstrong 2010)).

5.1.1 Sistema de secreción de tipo III

El TTSS es un aparato multiproteico, exclusivo de las bacterias Gram-negativas, que permite la inyección de las proteínas bacterianas directamente en el citoplasma de la célula eucariota. El TTSS es el principal factor responsable de la virulencia en EPEC, ya que es necesario para la formación de las lesiones A/E características de este patógeno (Fig. 9) (Jarvis, Giron *et al.* 1995).

El TTSS está compuesto por 20 a 25 proteínas diferentes, muchas de las cuales están conservadas en la mayoría de los sistemas de secreción de tipo III. Además, la mayoría de las proteínas conservadas en el TTSS poseen similitud de secuencia con proteínas que forman parte del flagelo bacteriano, lo cual sugiere un origen evolutivo común entre ambos sistemas (revisado en (Arnold, Jehl *et al.* 2010)).



El TTSS está formado por una ATPasa citosólica, un anillo en la membrana interna, un anillo en la membrana externa, un puente periplásmico y una aguja proteica extracelular. Además, el TTSS de EPEC está compuesto por varias proteínas adicionales codificadas por el locus LEE que están implicadas en la translocación o inyección de proteínas efectoras en el interior de la célula hospedadora. Estas proteínas translocadoras de EPEC se denominan Esp (*EPEC secreted protein*) A, EspB y EspD. La polimerización de subunidades de EspA da lugar a un filamento extracelular implicado en la adherencia inicial a la célula hospedadora. Las proteínas translocadoras EspB y EspD son secretadas posteriormente a la formación del filamento de EspA y forman el poro de translocación en la membrana de la célula hospedadora (revisado en (Clements, Young *et al.* 2012)).

5.1.2 Efectores LEE

Las proteínas efectoras son proteínas secretadas por la bacteria y translocadas al interior de la célula hospedadora donde normalmente controlan la señalización celular. Hasta la actualidad se han identificado siete genes en la isla de patogenicidad LEE que codifican para proteínas efectoras entre las que se incluyen: Tir, Map (*Mitochondrial-associated protein*), EspF, EspG, EspH, EspZ y EspB (esta última también es una proteína translocadora) (revisado en (Schmidt 2010)). La secreción y translocación de las proteínas efectoras está mediada por proteínas chaperonas bacterianas que impiden la agregación de los efectores y favorecen su estabilidad (revisado en (Arnold, Jehl *et al.* 2010)). Además, algunas chaperonas presentan una secuencia señal que les permite guiar a los efectores al TTSS (Chen, Ai *et al.* 2013). Una vez las proteínas efectoras son translocadas en el citoplasma de la célula hospedadora se dirigen a diversos compartimentos subcelulares y alteran diferentes rutas de transducción de señales.

Varios estudios *in vivo* empleando el modelo de ratón infectado por *Citrobacter rodentium* han demostrado que la proteína efectora Tir es esencial para la virulencia de la infección (revisado en (Dean and Kenny 2009)). Además, la proteína efectora Tir de CR presenta una funcionalidad semejante a la proteína Tir de EPEC (Deng, Vallance *et al.* 2003).

Los patógenos A/E también presentan otros elementos genéticos que codifican para efectores *non*-LEE, lo cuales pueden ser secretados a través del TTSS. Los efectores *non*-LEE están menos conservados que los efectores LEE en los patógenos A/E. EPEC codifica para un total de 21 efectores entre los que se incluyen los siete efectores LEE mencionados y varios efectores *non*-LEE como EspJ y EspL (Iguchi, Thomson *et al.* 2009). Mientras que se estima que EHEC podría codificar hasta 50 proteínas efectoras (Tobe, Beatson *et al.* 2006).

5.2 Receptor translocado de intimina, Tir

El receptor translocado de intimina Tir es una proteína efectora bacteriana codificada por el locus LEE. Tir es inyectado por el TTSS en el citoplasma de la célula hospedadora y posteriormente se inserta en la membrana plasmática a modo de horquilla (Kenny, DeVinney *et al.* 1997; Kenny 1999).

La proteína efectora Tir presenta una región extracelular, dos regiones transmembrana y una región citosólica donde se localizan los dominios C-terminal y N-terminal (Kenny 1999). La región extracelular del efector Tir reconoce e interacciona con una adhesina bacteriana denominada intimina que se localiza en la membrana externa de la bacteria (Kenny, DeVinney *et al.* 1997). Además, Tir desencadena la transducción de señales necesaria para promover la formación del pedestal de actina (revisado en (Lai, Rosenshine *et al.* 2013)).

La región extracelular de Tir contiene un dominio denominado IBD (*Intimin-Binding Domain*), por el cual es capaz de interactuar con alta afinidad con el dominio C-terminal de intimina (Kenny 1999; Luo, Frey *et al.* 2000). La adhesina bacteriana intimina está codificada por el gen *eae* localizado en la isla de patogenicidad LEE (Jerse, Yu *et al.* 1990). Tanto Tir como intimina son esenciales para la completa patogenicidad de la familia de bacterias A/E (Donnenberg, Tacket *et al.* 1993; Ritchie, Thorpe *et al.* 2003).

Un estudio estructural sugiere que la región IBD de Tir dimeriza con la región IBD de otra molécula de Tir y este dímero interactuaría con dos moléculas de intimina (Luo, Frey *et al.* 2000). Otro modelo propone que intimina se agrupa en dímeros en la membrana externa bacteriana. Según este modelo cada molécula del dímero de intimina interactuaría con la región IBD perteneciente a un dímero diferente de Tir, este tipo de interacción favorecería el agrupamiento o *clustering* de Tir en la membrana plasmática (Touze, Hayward *et al.* 2004).

El agrupamiento de Tir en la membrana plasmática promueve la fosforilación en el residuo de tirosina 474 situado en el extremo C-terminal de la proteína (Campellone and Leong 2005). Las proteínas tirosina quinasas c-Fyn (Phillips, Hayward *et al.* 2004), Abl, Arg (Swimm, Bommarius *et al.* 2004) y Etk (*Epithelial and endothelial tyrosine kinase*) son capaces de fosforilar a Tir durante la infección por EPEC (Bommarius, Maxwell *et al.* 2007).

La fosforilación en el residuo de tirosina 474 de Tir es necesaria para la polimerización de actina tras la infección por EPEC (Kenny 1999). Esto se debe a que el residuo Y474 fosforilado de Tir es reconocido por el dominio SH2 de las proteínas adaptadoras Nck1 y Nck2. Estas proteínas adaptadoras a su vez interactúan con el factor promotor de la

nucleación N-WASP, activando la polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3 (Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001).

Tir también es fosforilado en menor medida en el residuo Y454 (Campellone and Leong 2005). La fosforilación en el residuo Y454 de Tir parece estar implicada en la formación de pedestales de actina por un mecanismo independiente de Nck (Campellone and Leong 2005).

La proteína Tir sin modificar presenta un tamaño molecular de 78 kDa mediante análisis por SDS-PAGE. Sin embargo, se ha detectado que Tir puede presentar una masa molecular de hasta 90 kDa. Este aumento en la masa molecular de Tir es independiente de su fosforilación en residuos de tirosina (Kenny, DeVinney *et al.* 1997; Kenny 1999). La fosforilación *in vitro* de los residuos de serina S434 y S463 por la quinasa celular PKA (*Protein Kinase A*) es capaz de inducir dicho incremento en la masa molecular de Tir. Además, la fosforilación de Tir en residuos de serina parece promover cambios conformacionales en la proteína que podrían ser necesarios para que Tir se inserte en la membrana plasmática (Warawa and Kenny 2001).

5.3 Rutas de formación de pedestales de actina por EPEC

La principal vía de formación de pedestales por EPEC *in vitro* es la ruta dependiente de Nck basada en la activación de la polimerización de actina mediada por N-WASP y el complejo Arp2/3 (Fig. 10) ((Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001); revisado en (Lai, Rosenshine *et al.* 2013)). Durante la infección por EPEC, el efector bacteriano Tir es inyectado y se inserta en la membrana plasmática de la célula hospedadora. La región extracelular de Tir interacciona con la proteína bacteriana intimina localizada en la membrana extracelular de la bacteria (Kenny, DeVinney *et al.* 1997). Esta interacción favorece el agrupamiento de Tir en la membrana plasmática (Touze, Hayward *et al.* 2004). La proteína bacteriana Tir es fosforilada en el residuo de tirosina 474 localizado en su extremo citosólico C-terminal (Kenny 1999). La fosforilación de Tir en la posición Y474 es crucial para la formación del pedestal de actina. El residuo de tirosina 474 de Tir puede ser fosforilado de forma redundante por distintas proteínas tirosina quinasas celulares (Swimm, Bommarius *et al.* 2004).

Además, la inserción y el agrupamiento de Tir en la membrana plasmática promueven la localización de la proteína adaptadora Nck en la zona de la infección. Nck es capaz de interactuar a través de su dominio SH2 con una región de Tir de 12 aminoácidos que contiene el residuo Y474 fosforilado (Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001; Campellone, Giese *et al.* 2002).

De forma simultánea, la proteína adaptadora Nck es capaz de interactuar a través de sus dominios SH3 con el dominio PRR de N-WASP. Nck induce la activación de N-WASP en presencia de PIP_2 *in vitro* (Rohatgi *et al.*, 2001). Esta interacción promueve la localización de N-WASP en la zona de adherencia de la bacteria (Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001). A su vez, la proteína N-WASP es capaz de interactuar y activar al complejo Arp2/3, promoviendo la polimerización de actina necesaria para la formación del pedestal (Kalman, Weiner *et al.* 1999). Se ha descrito que N-WASP es crucial para la formación de pedestales por EPEC, ya que los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de N-WASP no son capaces de formar pedestales (Lommel, Benesch *et al.* 2001).

En los pedestales se localizan otras proteínas relacionados con el citoesqueleto de actina entre las que se incluyen proteínas implicadas en la formación de adhesiones focales como CrkII, α -actinina, ezrina, talina y vinculina (Finlay, Rosenshine *et al.* 1992; Goosney, DeVinney *et al.* 2001), así como proteínas implicadas en la regulación del complejo Arp2/3 como cortactina, entre otras (Cantarelli, Takahashi *et al.* 2000).

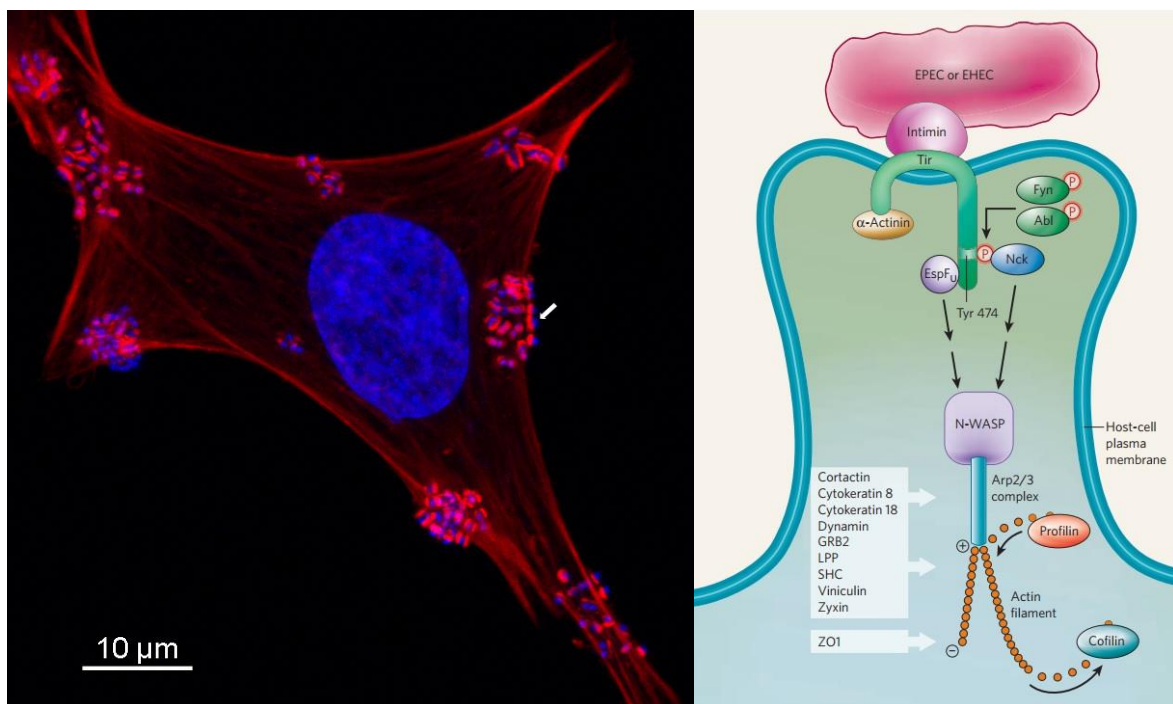
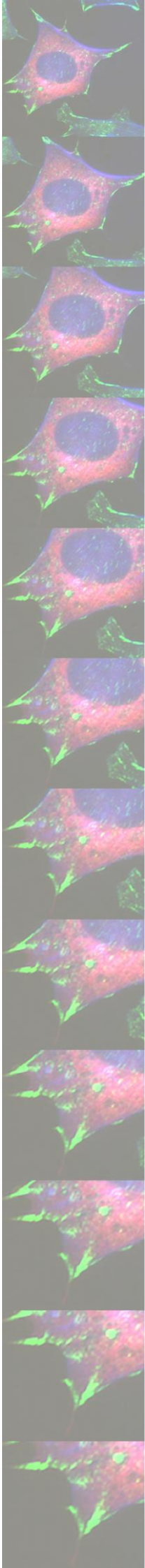


Figura 10. Señalización durante la formación del pedestal por EPEC. En la imagen de la izquierda se muestra una fotografía realizada con microscopio confocal de una tinción en células HeLa infectadas por EPEC durante 2 h. El citoesqueleto se ha marcado con faloidina (rojo) y los núcleos celulares y la bacteria con DAPI (en azul). Se señala con una flecha un pedestal. El dibujo de la derecha ha sido tomado de (Bhavsar, Guttman *et al.* 2007); *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature* 449(7164): 827-834 © 2007. <http://www.nature.com/>.

La formación de pedestales de actina por EPEC es promovida también por una ruta minoritaria independiente de Nck (Campellone and Leong 2005). En los fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en Nck, el número de pedestales formados tras la infección por EPEC disminuye drásticamente con respecto a las células WT. Además, la ruta independiente de Nck requiere la fosforilación en el residuo de tirosina 474, ya que en ausencia de esta tirosina el porcentaje de bacterias unidas capaces de formar pedestales se reduce al 2-5% (Campellone and Leong 2005).

La fosforilación en el residuo de tirosina 454 de Tir también contribuye a la formación del pedestal de actina por la ruta independiente de Nck (Campellone and Leong 2005). El residuo Y454 de la proteína efectora Tir expresada por EPEC forma parte de un motivo Asn-Pro-Tyr (NPY) que está conservado en EHEC y otros patógenos A/E (Campellone, Brady *et al.* 2006). Tir e intimina son factores de virulencia fundamentales para la colonización y la diarrea causada por EPEC. Sin embargo, numerosos modelos de infección *in vivo* con cepas mutantes han demostrado que la ruta Tir:Nck no es indispensable para la formación de las lesiones A/E (revisado en (Lai, Rosenshine *et al.* 2013)). A pesar de esto, los residuos Y454 y Y474 de Tir parecen promover una colonización eficiente de los patógenos A/E. En infecciones mixtas *in vivo* con una cepa de *Citrobacter rodentium* WT y una cepa de *Citrobacter rodentium* mutada en los residuos de tirosina 451 (Y454 en EPEC) y 471 (Y474 en EPEC) se produce una disminución de las unidades formadoras de colonia de la cepa mutante con respecto a la cepa WT, detectadas en las heces de ratones tras cuatro días de infección (Crepin, Girard *et al.* 2010).

OBJECTIVES



OBJECTIVES

Cortactin is regulated by tyrosine phosphorylation at the proline-rich domain and by lysine acetylation occurring mainly at the repeat region. Both modifications inhibit F-actin binding by the repeat region of cortactin. However, how the tyrosine phosphorylation and the lysine acetylation of cortactin relate to each other has not been established. In addition, tyrosine phosphorylation of cortactin is involved in the regulation of several actin dynamic processes including cell migration and invadopodia formation.

Part I: Study the tyrosine phosphorylation of cortactin and its effect in cell spreading.

To address this objective we pursued the following specific aims:

1. Study the relation between tyrosine phosphorylation and lysine acetylation of cortactin.
2. Study of the role of tyrosine phosphorylated cortactin during cell spreading.
3. Analysis of the interaction of tyrosine phosphorylated cortactin with FAK during cell spreading.

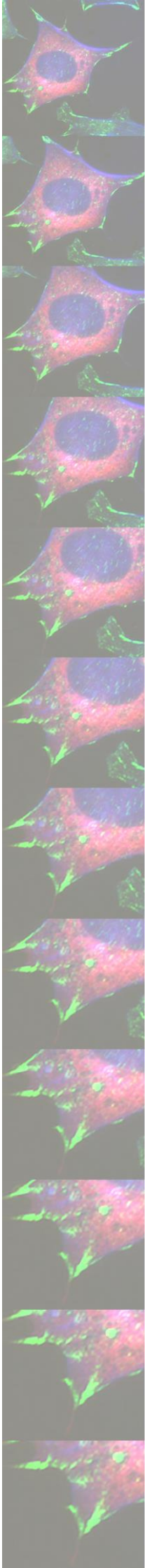
The adaptor protein CrkII is located at actin pedestals formed by EPEC (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Our group previously found that removing all isoforms of Crk family proteins increases the number of pedestals formed by EPEC (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Ph.D. dissertation). Therefore the aim of this Ph.D. thesis is to address the mechanism of the redundant inhibitory role of Crk adaptor proteins in actin pedestal formation by EPEC.

Part II: Study the redundant inhibitory role of Crk family adaptor proteins in pedestal formation by EPEC.

To elucidate this objective we developed the following specific goals:

1. Study the localisation of mutant Crk adaptor proteins during pedestal formation by EPEC.
2. Analysis of the phosphorylation status and localisation of Crk isoforms during pedestal formation by EPEC.
3. Investigate the interaction of the SH2 domain of CrkII and CrkL with the EPEC effector protein Tir.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Las líneas celulares se mantuvieron en medio *Iscoe's Modified Dulbecco's Media* (IMDM, Invitrogen). El medio IMDM fue suplementado con el 10% de suero fetal bovino (FBS, Lonza BioWhittaker, FisherScientific), el cual fue previamente calentado a 56 °C durante 30 minutos para inactivar las proteínas del complemento. Además, se añadió al medio 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen).

Las células se incubaron en una atmósfera al 95% de humedad, con una concentración de CO₂ del 5% y a una temperatura de 37 °C. Las líneas celulares se pasaron dos veces a la semana de forma rutinaria empleando una mezcla al 0,25% de tripsina y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para despegarlas de la placa de cultivo. Las líneas celulares se mantuvieron durante 25 pases y posteriormente se descartaron. La reserva de células se conservó en nitrógeno líquido empleando una solución de congelación compuesta por un 80% de FBS y un 20% de dimetil sulfóxido (DMSO), éste último utilizado como agente crioprotector.

Las líneas celulares empleadas en este estudio han sido las siguientes:

- **Línea celular SYF (deficientes en Src, Yes y Fyn).** Fibroblastos embrionarios de ratón que poseen mutaciones funcionales nulas en ambos alelos de los miembros Src, Yes y Fyn de la familia de las proteínas tirosina quinasas Src. Esta línea celular ha sido inmortalizada por infección con un vector retroviral que codifica para el antígeno T de SV40 (*Simian virus 40*) (Klinghoffer, Sachsenmaier *et al.* 1999). Las células SYF fueron obtenidas de la colección americana ATCC (*American Type Culture Collection*).
- **Línea celular SYF + c-Src (Rsrc).** Células SYF reconstituidas con c-Src empleando un vector retroviral pLXSH, fueron obtenidas de la colección americana ATCC (Klinghoffer, Sachsenmaier *et al.* 1999).
- **Línea celular HeLa** (células epiteliales derivadas de cáncer cérvico-uterino humano) fue obtenida de la colección americana ATCC.
- Fibroblastos embrionarios de ratón *Wild type* (**WT**) y derivados de ratones *knockout* de HDAC6 (**HDAC6^{-/-}**), inmortalizados por expresión estable del mutante dominante negativo de p53 (pCMVDD), fueron obtenidos del Dr. Tso-Pang Yao (Department of

Pharmacology and Cancer Biology, Duke University, Estados Unidos de América) (Gao, Hubbert *et al.* 2007).

- Los fibroblastos embrionarios de ratón **WT** y derivados de ratones *knockout* de *N-WASP* (**N-WASP^{-/-}**) fueron obtenidos del Dr. Scott B. Snapper (Massachusetts General Hospital, Boston, Estados Unidos de América) (Snapper, Takeshima *et al.* 2001).
- Los fibroblastos embrionarios de ratón **WT** y derivados de ratones *knockout* de *CrkL* (**CrkL^{-/-}**) fueron obtenidos del Dr. Akira Imamoto (Universidad de Chicago, Estados Unidos de América) (Guris, Fantes *et al.* 2001).
- Los fibroblastos embrionarios de ratón **WT** y derivados de ratones *knockout* de *Crk* (**CrkI/II^{-/-}**) fueron obtenidos del Dr. Thomas Curran (The Children's Hospital of Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos de América) (Park, Boyd *et al.* 2006).
- Los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Nck1/2* (**Nck1/2^{-/-}**) fueron obtenidos del Dr. Tony Pawson (Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá) (Bladt, Aippersbach *et al.* 2003).

2. Cultivos bacterianos

Las cepas empleadas en este estudio fueron:

- *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) (Genotipo: hsdS, gal (λ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gen 1).
- *E. coli* DH5 α (Genotipo: supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1).
- *E. coli* enteropatógena (EPEC): WT EPEC 0127:H6 cepa E2348/69 obtenida del Dr. Brett B. Finlay (Universidad de Columbia Británica, Vancouver, Canadá) (Levine *et al.*, 1978).
- *E. coli* enteropatógena mutante Δ *tir*: cepa E2348/69 con una delección *in frame* en el gen *tir* y con resistencia al ácido nalidíxico obtenida del Dr. Brendan Kenny (University of Newcastle, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido) (Kenny, DeVinney *et al.* 1997).

Las cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani sólido o líquido (LB, 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l de cloruro sódico) a 37 °C durante 16 horas. El medio sólido está compuesto por medio LB con 15 g/l de agar. Los cultivos en medio líquido se



incubaron en agitación a 200 revoluciones por minuto (r.p.m.). En ambos casos los cultivos se suplementaron con los antibióticos apropiados para la selección de transformantes, 100 µg/ml de ampicilina sódica (Duchefa Biochemie) o 30 µg/ml de sulfato de kanamicina (Sigma).

3. Preparación de bacterias competentes DH5α y BL21 por el método de Cloruro de Rubidio

Se transfirió una colonia aislada de la cepa DH5α o BL21 de *E. coli* a 5 ml de LB líquido y se incubó a 37 °C con agitación durante 16 horas. Posteriormente, dicho cultivo se transfirió a 500 ml de medio LB líquido y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0,5 medida a una longitud de onda de 600 nm (2-3 horas). A continuación se recogió el cultivo y se centrifugó a 1500 x g durante 15 minutos, a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y cada sedimento se resuspendió en 80 ml de tampón R1 previamente enfriado (R1: cloruro de rubidio 100 mM, cloruro de manganeso tetrahidratado 50 mM, acetato potásico 30 mM, cloruro cálcico dihidratado 10 mM, glicerol 15% v/v, ajustando el pH a 5,8 con ácido acético). Esta mezcla se mantuvo en hielo 15 minutos y seguidamente se recogieron las bacterias por centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos, a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió cada sedimento en 20 ml de tampón R2 previamente enfriado (R2: MOPS 10 mM, cloruro de rubidio 10 mM, cloruro cálcico dihidratado 75 mM y glicerol 15% v/v, ajustando el pH a 6,5 con hidróxido sódico). Esta mezcla se mantuvo 15 minutos en hielo y a continuación se repartieron las células en alícuotas de 500 µl en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml fríos que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

4. Transformación por choque térmico

Para hacer la transformación por choque térmico se emplearon 50 µl de bacterias competentes *E. coli* DH5α que fueron descongeladas y se añadieron 0,2-0,5 µg del ADN plasmídico. Las bacterias competentes con el DNA se mantuvieron 30 minutos en hielo. A continuación fueron sometidas a choque térmico a 42 °C sin agitación durante 45 segundos, seguidamente se incubaron 1 minuto en hielo, se añadieron 200 µl de medio LB y se incubaron a 37 °C con agitación durante una hora. Por último se sembraron 100 µl de dicha mezcla en placas de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y fueron incubadas a 37 °C durante 16 horas para la obtención de colonias transformantes.

Para la transformación de la cepa *E. coli* BL21, antes de añadir el ADN plasmídico se añadió β-mercaptoetanol a una concentración final de 0,287 mM y se mantuvieron las

bacterias competentes en hielo durante 10 minutos. El resto del proceso se realizó de la misma manera que en *E. coli* DH5 α .

Para la conservación de transformantes se creció una colonia aislada en 4 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Una fracción de dicho cultivo se mezcló con glicerol estéril a una concentración final del 15% y seguidamente se congeló a -80 °C.

5. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*

La purificación del ADN plasmídico a pequeña escala (*miniprep*) se realizó a partir de 3 ml de un cultivo líquido de una colonia aislada de *E. coli* cepa DH5 α transformada con la construcción correspondiente. El cultivo líquido se realizó con LB suplementado con el antibiótico adecuado (ampicilina 100 μ g/ml o kanamicina 30 μ g/ml) y se incubó con agitación durante 16 horas a 37 °C. Posteriormente, el cultivo se sometió a centrifugación y el sedimento fue procesado utilizando el kit comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones provistas por el kit.

Para la purificación del ADN plasmídico a media escala (*midiprep*), se realizó un cultivo a partir de una colonia aislada de *E. coli* cepa DH5 α , transformadas con la construcción correspondiente. La colonia se creció en 4 ml de LB suplementado con el antibiótico adecuado y se incubó a 37 °C con agitación durante 8 horas. Posteriormente se transfirieron 2 ml del cultivo inicial a 200 ml y se incubó a 37 °C con agitación durante 16 horas. El cultivo se sometió a centrifugación y el sedimento fue procesado empleando un kit comercial de purificación de ADN por medio de columnas de intercambio iónico, libre de endotoxinas, el cual está indicado para realizar transfecciones (*JetStar 2.0 Midi columns*, Genomed). Una vez purificado el ADN plasmídico se resuspendió en agua Milli-Q purificada libre de nucleasas y se dejó a 4 °C con agitación durante 16 horas.

La concentración del ADN plasmídico se calculó a partir de los valores de absorbancia obtenidos a 260 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro, aplicando la fórmula de la ley de Lambert-Beer ($A=\alpha lc$, donde A es la absorbancia a D.O. a 260 nm, α el coeficiente de absorción, l la longitud atravesada por la luz en el medio y c la concentración). Se utilizó ADN plasmídico con una pureza (D.O. 260/D.O. 280) próxima a 1,8. Finalmente el ADN plasmídico purificado, a media escala, se dejó a una concentración final de 1 μ g/ μ l.

6. Construcciones

Las construcciones empleadas en la presente tesis doctoral han sido agrupadas en la tabla 1.

Tabla 1. Construcciones empleadas en la Parte I (en blanco) y en la Parte II (en gris) de los Resultados.

Nombre del plásmido	Procedencia
pcDNA3 HA vacío	Cedido por la Dr. Susana Alemany (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad Autónoma de Madrid).
pcDNA3 Myc vacío	Cedido por el Dr. Leandro Sastre (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad Autónoma de Madrid).
pEBB HAΔSrc	Cedido por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América).
pEBB MycCortactina	Cedido por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América).
pEBB ZipA-HAΔSrc	Cedido por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América).
pEBB ZipB-MycCortactina	Cedido por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América).
pEBB ZipB-MycCortactina3F	Producido por la Dra. Narcisa Martínez Quiles a partir de pEBB ZipB-MycCortactina por mutagénesis dirigida.
pGEX-6P2 GST vacío	Comercial.
pGEX-6P2 SH3 cortactina	Producido por la Dra. Narcisa Martínez Quiles.
pACYC184 <i>ptir</i>	Cedido por el Dr. Brendan Kenny (University of Newcastle, Reino Unido).
pACYC184 <i>ptir</i> Y474F	Cedido por el Dr. Brendan Kenny (University of Newcastle, Reino Unido).
pCAGGS Myc-CrkII	Cedido por el Dr. Michiyuki Matsuda (Osaka University, Japón).
pCAGGS Myc-CrkII-R38V	Cedido por el Dr. Michiyuki Matsuda (Osaka University, Japón).
pEBB Flag-Nck2	Cedido por el Dr. Gonzalo Rivera (Texas A&M University, Texas, Estados Unidos de América).
pEBB SH2-CrkII- <i>Green Fluorescent Protein</i> (GFP)	Cedido por el Dr. Gonzalo Rivera (Texas A&M University, Texas, Estados Unidos de América).
pGEX-4T SH2-Nck1	Cedido por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América).
pGEX-6P1 SH2-CrkII	Cedido por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América).
pGEX-6P1 SH2-CrkL	Cedido por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América).

6.1 Construcciones empleadas en la Parte I de los Resultados

6.1.1 Construcciones del sistema *Functional Interaction Trap*

El sistema FIT consiste en clonar en un vector de expresión el gen que codifica para una quinasa carente de sus dominios de unión a proteínas, y en otro vector el de su proteína sustrato. Cada uno de estos vectores de expresión contiene una secuencia que codifica para una hélice superenrollada rica en residuos de leucina, denominada dominio Zip (Zip proviene de la palabra inglesa *zipper*, cuya traducción es cremallera).

Las dominios Zip de la quinasa y el sustrato del sistema FIT son complementarias y al expresarse en la célula forman un motivo estructural denominado cremallera de leucinas (Arndt, Pelletier *et al.* 2000). Por tanto, al co-transfectar los vectores del sistema FIT en las células se expresan las proteínas de fusión que interaccionan a través de los dominios Zip complementarios. De este modo, el sistema FIT favorece una fosforilación específica del sustrato (Fig. 11, dibujo esquemático) (Sharma, Antoku *et al.* 2003; Sharma and Mayer 2008).

En este estudio, la quinasa Src clonada en los vectores del sistema FIT carece del dominio SH2, que reconoce sustratos fosforilados en residuos de tirosina (Songyang, Shoelson *et al.* 1993) y del dominio SH3, que reconoce sustratos ricos en residuos de prolina (Yu, Chen *et al.* 1994). Estos dominios han sido eliminados para forzar la interacción específica de la quinasa Src con el sustrato de interés. La construcción de la quinasa Src está fusionada a un dominio rico en leucinas denominado ZipA y a la etiqueta HA en el extremo carboxilo terminal, para facilitar su detección. Dicha construcción de Src ha sido abreviada como ZipA-HAΔSrc.

Por otro lado, cortactina está fusionada al dominio rico en leucinas ZipB, complementario al dominio ZipA, y a la etiqueta Myc en el extremo amino terminal. La construcción de cortactina ha sido abreviada como ZipB-MycCortactina.

Las construcciones del sistema FIT que se detallan a continuación han sido generosamente cedidas por el Dr. Bruce J. Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América):

- ZipA-HAΔSrc: codifica la proteína v-Src carente de los dominios SH2 y SH3, fusionada en el extremo C-terminal al dominio ZipA rico en residuos de leucina y a la etiqueta HA, ligados en un vector pEBB.
- HAΔSrc: codifica la proteína v-Src carente del dominio SH2 y SH3, fusionada en el extremo C-terminal a la etiqueta HA, ligada en un vector pEBB.
- MycCortactina: codifica la proteína cortactina de ratón fusionada a la etiqueta Myc, ligada en un vector pEBB.
- ZipB-MycCortactina: codifica la proteína cortactina de ratón fusionada en el extremo N-terminal a la etiqueta Myc y al dominio rico en residuos de leucina ZipB, ligada en un vector pEBB.

Como controles de transfección se usaron las siguientes construcciones:

- La etiqueta Myc ligada en un vector pcDNA3, denominada Myc vacío.
- La etiqueta HA ligada en un vector pcDNA3, denominada HA vacío.

6.1.2 El mutante ZipB-MycCortactina3F

El triple mutante ZipB-MycCortactina3F que contiene las mutaciones Y421F, Y466F y Y482F (abreviado como 3F) fue generado por Narcisa Martínez Quiles. Para ello se llevó a cabo una mutagénesis dirigida mediante PCR usando el kit *QuikChange site-directed* (Stratagene). Primero se generó la mutación Y421F en la construcción ZipB-MycCortactina haciendo uso del kit antes mencionado y la secuencia fue verificada por secuenciación en el servicio de Genómica de la UCM. Una vez se comprobó que se había generado la mutación Y421F, se introdujo una doble mutación Y466F, Y482F sobre dicho mutante utilizando el mismo kit. Finalmente se secuenció todo el inserto de cortactina con las tres mutaciones, y una vez comprobado que no presentaba ninguna mutación no deseada, se realizó una digestión con las enzimas de restricción Bam HI y NotI, y se ligó el inserto a un nuevo vector ZipB-Myc vacío. En la verificación de las secuencias también participó la autora de la presente tesis doctoral.

6.1.3 Cortactina fusionada a la etiqueta GST

La construcción de cortactina de ratón insertada en el vector pGEX-6P2 fue generada por la Dra. Narcisa Martínez Quiles. El fragmento que contiene el dominio SH3 de cortactina (residuos 458-546) denominado Δ SH3 fue generado mediante PCR usando GST-Cortactina FL (*Full Length*) como molde. Los productos de PCR fueron verificados por secuenciación y clonados en un vector pGEX-6P2 (Martínez-Quiles, Ho *et al.* 2004).

6.2 Construcciones empleadas en la Parte II de los Resultados

El vector pCAGGS-myc-CrkII que codifica para la proteína de rata CrkII y el vector pCAGGS-myc-CrkII-R38V (R38V) que codifica para la proteína de rata CrkII mutada en el dominio SH2 con una sustitución del residuo de arginina 38 a un residuo de valina, ambos fusionados a la etiqueta Myc, fueron cedidos generosamente por el Dr. Michiyuki Matsuda (Osaka University, Japón) (Hashimoto, Katayama *et al.* 1998). El plásmido pCAGGS confiere resistencia a ampicilina. Como control de la transfección se empleó la etiqueta Myc en un vector pcDNA3.

La cepa de EPEC delecionada para el gen *tir* fue transformada por electroporación con diferentes ADN plasmídicos por Elvira Nieto-Pelegri. *ptir* es un plásmido pACYC184 de baja copia y contiene los genes *3' map*, *tir* y *cesT* (Kenny and Warawa 2001). *ptirY474F* es un plásmido *ptir* que codifica para Tir con una sustitución del residuo de tirosina 474 a

fenilalanina. Las cepas transformadas con el plásmido pACYC184 fueron seleccionadas en placas con LB y cloranfenicol (25 µg/ml, concentración final). Estos plásmidos fueron cedidos por el Dr. Brendan Kenny (University of Newcastle, Reino Unido).

Las siguientes construcciones fueron cedidas amablemente por el Dr. Bruce Mayer (University of Connecticut Health Center, Estados Unidos de América):

- El dominio SH2 de Nck1 fusionado a la etiqueta GST (residuos desde el 275 al 377) en un vector pGEX-4T.
- El dominio SH2 de CrkII fusionado a GST (residuos desde el 1 al 124) en un vector pGEX-6P1.
- El dominio SH2 de CrkL fusionado a GST (residuos desde el 9 al 108) en un vector pGEX-6P1.

Los plásmidos pEEB SH2-CrkII-GFP (dominio SH2 aislado de la proteína adaptadora CrkII) y pEEB-Flag-Nck2 fueron generosamente cedidos por el Dr. Gonzalo Rivera (Texas A&M University, Estados Unidos de América).

7. Transfecciones y procesamiento de las células

Las células se sembraron a la densidad adecuada para alcanzar una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección. Además, las células se mantuvieron en medio IMDM suplementado con FBS al 10%, sin antibiótico, durante las 4 horas previas a la transfección. Las transfecciones en fibroblastos embrionarios de ratón se llevaron a cabo con Lipofectamina 2000 *reagent* (Invitrogen) empleando distintas cantidades de ADN según el tamaño de la placa a transfectar siguiendo el protocolo del reactivo proporcionado por la casa comercial (4 µg por pocillo de 9,5 cm², 24 µg de ADN para placas de 56 cm², 40 µg para placas de 145 cm²). Tras la transfección las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 22 horas. Las transfecciones en células HeLa se realizaron usando Eugene (Roche) de acuerdo al protocolo recomendado y se obtuvieron resultados similares.

Las células se lavaron 1 vez con Dulbecco's PBS a 4 °C (D-PBS: tampón fosfato salino que contiene calcio y magnesio, Sigma-Aldrich), se añadió tampón de lisis y se recogieron utilizando un rascador de plástico. Los tampones de lisis empleados en función del procesamiento posterior fueron:

- Laemli 2x (24 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 0,8% dodecil sulfato sódico (SDS), 6 mM β-mercaptoetanol y 0,04% azul de bromofenol).

- RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 15% glicerol, 2 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), cocktail de inhibidores (Amersham), 0,1% SDS, inhibidor de fosfatasas (PhosSTOP, Roche), 1% Triton X-100).

Se añadieron diferentes volúmenes de tampón de lisis en función de la superficie de la placa utilizada (200 μl por pocillo de 9,5 cm^2 , 300 μl para placas de 56 cm^2 , 600-750 μl para placas de 145 cm^2). A continuación las muestras fueron homogenizadas pasándolas 3 veces por una jeringa con una aguja de calibre 25GA. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 21000 x g a 4 °C (14.000 r.p.m. en una centrífuga de sobremesa estándar) y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

8. Tratamiento *siRNA*

La inhibición de la expresión de la proteína CrkL (humana), de las proteínas CrkI/II (humana) y el control de la inhibición fueron efectuados usando un kit de *siRNA* de Santa Cruz Biotechnology, siguiendo las instrucciones suministradas. Las células HeLa fueron sembradas en pocillos de 9,5 cm^2 a la densidad adecuada para tener una confluencia del 50-60% en el momento de administrar el tratamiento. Las células fueron transfectadas con una mezcla de 40 nmoles de *siRNA* dúplex y un volumen 1:1 de reactivo de transfección *siRNA* (Santa Cruz Biotechnology) en 1 ml de medio IMDM sin suero. Después de 6 horas de transfección se añadió 1 ml de medio con el 20% de suero a las células para conseguir una concentración final del 10% de FBS, y se incubaron durante 16-20 horas más antes de ser infectadas con EPEC.

9. Expresión de proteínas en *E. coli*

Las proteínas fusionadas a GST fueron expresadas en la cepa *E. coli* BL21. Las bacterias transformadas con los plásmidos de expresión (pGEX-6P2 vacío, pGEX-6P2 SH3 cortactina, pGEX-2T SH2-Nck, pGEX-6P1 SH2-CrkII o pGEX-6P1 SH2-CrkL) fueron cultivadas en 4 ml de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 16 horas con agitación a 37 °C. Se transfirieron 2-3 ml de dichos cultivos a 200 ml de medio LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron durante 4 h a 37 °C con agitación hasta una D.O. 0,6-0,7 medida a una longitud de onda de 600 nm. A continuación se indujo la expresión de las proteínas fusionadas a GST con isopropil β -D-tiogalactosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM durante 3 h. El cultivo bacteriano se sometió a centrifugación a 5000 x g durante 10 min, a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos se conservaron a -80 °C hasta verificar la expresión de las proteínas. Para ello se recogieron 50 μl del cultivo de bacterias antes de la inducción con IPTG y después de la inducción con IPTG. La expresión de proteínas fue analizada mediante separación electroforética de las proteínas

empleando geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. Posteriormente se efectuó una tinción del gel con azul de *Coomassie* (0,25% azul de *Coomassie* brillante R-250, 45% metanol y 10% ácido acético glacial) durante 20 min a temperatura ambiente. El gel fue desteñido con una solución compuesta por metanol al 10% y ácido acético glacial al 10%.

Posteriormente dichos sedimentos fueron resuspendidos en 10 ml de PBS (BD Bioscience). A esta suspensión se añadió lisozima a una concentración final de 0,1 mg/ml, PMSF a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 5 min en hielo. A continuación se añadió Triton X-100 a una concentración final de 1% y las suspensiones fueron sonicadas 3 veces durante 30 segundos en un sonicador Vibra Cell (Sonios Materials). Seguidamente se centrifugaron durante 20 min a 10000 x g a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados, cuando fue necesario, con filtros de 0,45 µm y se añadieron 200 µl esferas de glutatión sefarosa (4 Fast Flow beads GSH, Amersham Bioscience) previamente lavadas con PBS. Los sobrenadantes con las esferas fueron incubados durante 4 h con rotación a 4 °C, posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 3000 x g, a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Las esferas se lavaron tres veces con una solución de PBS con tween-20 al 0,1% frío y otras tres veces únicamente con PBS frío. Finalmente se resuspendieron en un volumen final de 1 ml de PBS 1X y se conservaron a 4 °C. Las proteínas fusionadas a GST unidas a las esferas de glutatión sefarosa se analizaron por SDS-PAGE y tinción de azul de *Coomassie* y posteriormente fueron empleadas en ensayos *Pull Down* (PD).

10. Ensayos *Pull down*

Las esferas de glutatión sefarosa unidas a las proteínas recombinantes previamente purificadas (20-30 µl) fueron incubadas a 4 °C con rotación durante 5 h con 150 µl del lisado de células recogidas en tampón de lisis RIPA, para cada ensayo PD. Posteriormente se lavaron 3 veces con el tampón RIPA diluido 1/10 en PBS, y finalmente se resuspendieron en 35 µl de tampón Laemli 2X.

11. *Western-blot*

11.1 Electroforesis de proteínas

Los lisados celulares resuspendidos en Laemli 2x se hirvieron a 99 °C durante 4 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 21000 x g, a 4 °C. A continuación se llevó a cabo una separación electroforética de las proteínas empleando geles de poliacrilamida a una concentración del 10% en presencia de SDS (SDS-PAGE). En los geles se cargaron 20 µl de los lisados celulares y 35 µl de cada inmunoprecipitación o PD. La electroforesis se realizó en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad) a 150 voltios (V) durante 70 min. La

composición del tampón de electroforesis es de 192 mM glicina, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl (pH 8,3). El peso molecular (MW) de las proteínas fue estimado empleando un patrón de pesos moleculares comercial (Invitrogen o BioRad).

11.2 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas separadas durante la electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 6 x 9 cm (Hybond, Amersham, 0,45 μ m RPN303D). Se utilizaron cubetas de transferencia en húmedo Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó con una intensidad de corriente de 300 miliamperios (mA) durante 90 min. La composición del tampón de transferencia es 25 mM Tris Base, 192 mM Glicina y 20% metanol (pH 8,3).

11.3 Inmunodetección

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con una solución de bloqueo comercial (*blocking buffer*, Fisher Scientific) durante 1 h. A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en la solución de bloqueo con el 0,1% de Tween 20 (Tabla 2). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 16 horas en agitación, a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se llevaron a cabo 4 lavados de 5 minutos con PBS al 0,1% de Tween 20 (T-PBS) y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario en la solución de bloqueo al 0,1% de Tween 20 (Tabla 3). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con los fluorocromos correspondientes durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 4 lavados con T-PBS de la forma ya descrita.

Finalmente las membranas se escanearon usando el escáner *Odyssey Infrared System* (LI-COR, Fisher Scientific). Este escáner posee dos canales de infrarrojo permitiendo la detección directa de fluorescencia en las longitudes de onda 680 nm (color rojo) y 800 nm (color verde) de forma simultánea. En el caso de incubaciones con dos anticuerpos primarios de diferente origen que reconocen la misma proteína, detectados en los dos canales, se llevaron a cabo incubaciones secuenciales, incubando en primer lugar con el anticuerpo primario de menor afinidad.

Para reincubar la membrana con otros anticuerpos, se eliminaron los anticuerpos primarios y secundarios unidos a la membrana. Para ello se incubaron las membranas con una solución comercial *Nitro Stripping buffer* (LI-COR, Fisher Scientific) durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente las membranas se incubaron únicamente con el anticuerpo secundario y se volvió a escanear la membrana para confirmar que no se detecta señal del anticuerpo primario, antes de añadir el siguiente anticuerpo primario

correspondiente. El marcador de peso molecular se detectó en el canal rojo (700 nm). En algunas figuras se enseña el marcador y en el resto está representado con líneas negras en el lado izquierdo de la figura.

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en la detección por *Western Blot*.

Anticuerpo primarios	Tipo	Casa Comercial/ Referencia	Concentración	Dilución usada
Anti-acetil-cortactina	Policlonal de conejo	Dr. Edward Seto (Cancer Center and Research Institute, Florida, EEUU)	-	1/1000
Anti-acetil-cortactina	Policlonal de conejo	Millipore #09-881	1 µg/µl	1/400
Anti-actina clon C4	Monoclonal de ratón	MP Biomedicals #69100	-	1/150000
Anti-cortactina (EP 1922Y)	Monoclonal de conejo	Novus Biologicals NB110-55723	-	1/1000
Anti-cortactina	Policlonal de conejo	Applied Biological Materials (ABM) #Y021264	1 µg/µl	1/500
Anti-cortactina 4F11	Monoclonal de ratón	Millipore #05-180	1 µg/µl	1/1000
Anti-CrkI/II (clone 22)	Monoclonal de ratón	BD Biosciences Pharmingen 610035	0,25 µg/µl	1/500
Anti-CrkL	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology (SC) sc-319	0,2 µg/µl	1/400
Anti-FAK	Policlonal de conejo	Cell signalling #3285S	-	1/250
Anti-FAK	Monoclonal de ratón	BD Biosciences 610087	0,25 µg/µl	1/100
Anti-Flag M2	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich F3165	-	1/1000
Anti-fosfotirosina	Monoclonal de ratón	Cell signalling #9411	-	1/1000
Anti-fosfotirosina -207 CrkL	Policlonal de conejo	Cell signalling	-	1/250
Anti-fosfotirosina- 421 cortactina (pY421)	Policlonal de conejo	Abcam ab47768	1 µg/µl	1/1000
Anti-fosfotirosina 4G10 Platinum (4G10® (IgG2bk)+ PY20 (IgG2b))	Mezcla de dos anticuerpos monoclonales de ratón	Millipore #05-1050X	-	1/1000
Anti-fosfotirosina-118 paxilina	Policlonal de conejo	Cell signalling #2541S	-	1/500
Anti-fosfotirosina-221 CrkII	Policlonal de conejo	Abcam	-	1/200

Anti-fosfotirosina-466 cortactina (pY466)	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology (SC) sc-101661	0,1 µg/µl	1/1500
Anti-GFP	Policlonal de conejo	BD Biosciences	1 µg/µl	1/500
Anti-GFP JL8	Monoclonal de ratón	Clontech 632381	1 µg/µl	1/1000
Anti-HA	Policlonal de conejo	Clontech 631207	0,1 µg/µl	1/100
Anti-HDAC6, CT	Policlonal de conejo	Millipore #07-732	1 µg/µl	1/1000
Anti-Myc 4A6	Monoclonal de ratón	Millipore #05-724	1 µg/µl	1/750
Anti-N-WASP (30D10)	Monoclonal de conejo	Cell signalling #4848	-	1/500
Anti-Src GD11	Monoclonal de ratón	Millipore #05-184	1 µg/µl	1/500
Anti-Tir	Policlonal de conejo	Dr. Brendan Kenny (University of Newcastle, Reino Unido)	-	1/15000
Anti-Tir 2A5 (N-terminal)	Monoclonal de ratón	Dr. Brett Finlay (University of British Columbia, Canada)	-	1/1000
Anti-tubulina alfa (clone YOL1/34)	Monoclonal de rata	AbD Serotec MCA78G	1 mg/ml	1/15000

Tabla 3. Anticuerpos secundarios empleados en la detección por *Western Blot*.

Anticuerpos secundarios	Tipo	Casa Comercial	Concentración	Dilución
Alexa Flúor 680 (rojo)	Policlonal Cabra anti-ratón IgG (H+L)	Invitrogen	2 mg/ml	1/7000
IRDye 680 LT (rojo)	Policlonal Cabra anti-conejo IgG (H+L)	Fisher Scientific LI-COR Biosciences	1 mg/ml	1/5000
IRDye 800 CW (verde)	Policlonal Cabra anti-ratón IgG (H+L)	Fisher Scientific LI-COR Biosciences	1 mg/ml	1/5000
IRDye 800 CW (verde)	Policlonal Cabra anti-conejo IgG (H+L)	Fisher Scientific LI-COR Biosciences	1 mg/ml	1/5000
IRDye 800 CW (verde)	Policlonal Cabra anti-rata IgG (H+L)	Fisher Scientific LI-COR Biosciences	1 mg/ml	1/5000

12. Inmunoprecipitación

Las células se sembraron en placas de 145 cm² a una confluencia del 70-80%. En los experimentos indicados se realizaron transfecciones durante 20-24 horas, tras lo cual se realizó un lavado con D-PBS a 4 °C. A continuación se recogieron las células en 750 µl de tampón de lisis RIPA. Para bloquear la deacetilación de cortactina, el tampón de lisis RIPA fue suplementado con 400 ng/ml de *Trichostatin A* (TSA, T1952, Sigma Aldrich) (Zhang,

Yuan *et al.* 2007) en los experimentos indicados. Los lisados celulares se recogieron empleando un rascador de plástico y se procesaron como se ha mencionado anteriormente.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación (IP) empleando un anticuerpo monoclonal de ratón se emplearon 30 μ l de bolitas magnéticas (Dynabeads Pan Mouse IgG, Invitrogen) por muestra. Éstas se lavaron una vez y se bloquearon durante 10 min con PBS al 0,1% de BSA (*Bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) haciendo uso del imán DynaMag-2 (Invitrogen) para recolectar las bolitas magnéticas. Para llevar a cabo la inmunoprecipitación empleando un anticuerpo policlonal de conejo se utilizó el kit de inmunoprecipitación Dynabeads Proteína G (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones provistas por el kit.

Tabla 4. Anticuerpos empleados para IP.

Anticuerpo primarios	Tipo	Casa Comercial/ Referencia	Concentración
Anti-acetil-cortactina	Policlonal de conejo	Millipore #09-881	1 μ g/ μ l
Anti-cortactina 4F11	Monoclonal de ratón	Millipore #05-180	1 μ g/ μ l
Anti-Crkl/II (clone 22)	Monoclonal de ratón	BD Biosciences Pharmingen 610035	0,25 μ g/ μ l
Anti-FAK 2A7	Monoclonal de ratón	Millipore #05-182	0,63 μ g/ μ l
Anti-fosfotirosina	Monoclonal de ratón	Cell signaling #9411	-
Anti-fosfotirosina-466 cortactina (pY466)	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology sc-101661	0,1 μ g/ μ l
Anti-IgG de conejo	Policlonal de conejo	Calbiochem	1,7 μ g/ μ l
Anti-IgG1 de ratón <i>Myeloma</i>	Monoclonal de ratón	Calbiochem 401122	1 μ g/ μ l
Anti-Myc 4A6	Monoclonal de ratón	Millipore #05-724	1 μ g/ μ l

A continuación, las bolitas se incubaron con 4 μ g de anticuerpo para cada IP (Tabla 4) durante 1 hora con rotación a 4 °C y se empleó la misma cantidad del anticuerpo correspondiente como control de isotipo. Posteriormente las bolitas se lavaron una vez con una solución de PBS y BSA al 0,1% o con la solución de lavado provista en el kit para proteína G y se incubaron durante 3 horas con 150 μ l de lisado celular. Seguidamente se lavaron 3 veces con 200 μ l tampón RIPA (suplementado con TSA 400 ng/ml en caso necesario) diluido 1/10 en PBS. Finalmente se resuspendieron en tampón Laemli 2x (35 μ l) y fueron conservadas a -80 °C o hervidas para efectuar la electroforesis SDS-PAGE.

13. Inmunofluorescencia indirecta y tinciones

Las células se sembraron a un 70-80% de confluencia en placas de 6 pocillos con cuatro cubreobjetos esterilizados por pocillo. Después de 20-24 horas de transfección, las células fueron lavadas con D-PBS frío y se fijaron con 1 ml de solución de formalina (solución que contiene formaldehído 4% p/v, Sigma-Aldrich) durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces con PBS y se conservaron en dicho tampón a 4 °C hasta su uso.

Para llevar a cabo las inmunofluorescencias indirectas (IFIs) o las tinciones, las células fijadas se permeabilizaron en una solución de PBS y Triton X-100 al 0,1% durante 5 min. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon en una solución de PBS y BSA al 2% durante 10 min. A continuación, para las IFIs las células bloqueadas se incubaron con la correspondiente dilución del anticuerpo primario en PBS-BSA 2% durante 1 hora (Tabla 5). Seguidamente se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con una dilución adecuada del anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo correspondiente (Tabla 6).

Para la detección del citoesqueleto de actina se efectuó una tinción con Faloidina-TRITC (rojo, isotiocianato de tetrametil-rodamina, Sigma-Aldrich P1951) a una concentración de 1 µg/ml de o Faloidina 350 (azul) a una concentración de 0,264 µM (Molecular Probes, Invitrogen A22281). Para la detección del ADN de las bacterias y de los núcleos celulares se efectuó una tinción con 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) a una concentración de 300 nM. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos añadiendo 5 µl de medio de montaje por cubre (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 10% Mowiol 4-88, Calbiochem; 25% glicerol y fenilendiamina, Sigma-Aldrich P6001), se dejaron secar a temperatura ambiente durante 16 horas y se sellaron en los bordes con laca de uñas transparente.

Los microscopios empleados en la presente tesis doctoral han sido los siguientes:

- Las imágenes de las Figs. 23 24, 34, 35A, 36 fueron tomadas en el Parque Científico de Madrid empleando un microscopio Confocal Leica SP2/DM IRE2 con un objetivo de aceite de inmersión 60× y procesadas con el software Leica (versión 2.61).
- Las imágenes de las Figs. 22 y 26 fueron tomadas en el Departamento de Microbiología II (UCM) con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 200-U con un objetivo de aceite de inmersión 100×, equipado con una cámara Hamamatsu y se procesaron usando el programa Adobe Photoshop CS3.
- Las imágenes de las Figs. 30, 31, 32 y 35B fueron tomadas en el Departamento de Microbiología I (UCM) con un microscopio de fluorescencia Zeiss AX10 Imager A.1

con un objetivo de aceite de inmersión 100×, equipado con una cámara AxioCam MRm y se procesaron utilizando el programa AxioVision Release 4.7.

- La imagen de la Fig. 29 fue tomada en el Bioimaging Facility, Faculty of Life Sciences (University of Manchester) con un microscopio Delta Vision RT (Applied Precision) equipado con un objetivo de aceite de inmersión 60×/1.42 Plan Apo (Zeiss) y con una cámara CoolSnap HQ (Photometrics). La imagen fue analizada con el programa ImageJ.

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados en IFI.

Anticuerpos primarios	Tipo	Casa Comercial/ Referencia	Concentración	Dilución
Anti-Flag M2	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich F3165	-	1/300
Anti-fosfotirosina 207 CrkL	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich SAB4503814	1 µg/µl	1/100
Anti-fosfotirosina 221 CrkII	Policlonal de conejo	Cell signaling #3491	-	1/100
Anti-fosfotirosina-466 cortactina (pY466)	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology sc-101661	0,1 µg/µl	1/300
Anti-Myc 4A6	Monoclonal de ratón	Millipore #05-724	1 µg/µl	1/700
Anti-Myc A14 TRITC	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology sc-789	0,2 µg/µl	1/100
Anti-Vinculina	Monoclonal de ratón	Millipore MAB3574	1 µg/µl	1/700

Tabla 6. Anticuerpos secundarios empleados en IFI.

Anticuerpo secundarios	Tipo	Casa Comercial/ Referencia	Concentración	Dilución
Alexa Flúor 405 (azul)	Cabra anti-ratón IgG	Molecular Probes, Invitrogen A31553	2 µg/µl	1/750
Alexa Flúor 488 (verde)	Cabra anti-ratón IgG	Molecular Probes, Invitrogen A11001	2 µg/µl	1/1000
Alexa Flúor 488 (verde)	Cabra anti-conejo IgG	Molecular Probes, Invitrogen A11008	2 µg/µl	1/1500
Alexa Flúor 568 (rojo)	Cabra anti-ratón IgG	Molecular Probes, Invitrogen A-11004	2 µg/µl	1/1000
Alexa Flúor 568 (rojo)	Cabra anti-conejo IgG	Molecular Probes, Invitrogen A11011	2 µg/µl	1/1500

13.1 Cuantificación de los pedestales

Las tinciones con Faloidina-TRITC y DAPI fueron empleadas para efectuar la cuantificación de los pedestales de actina. Haciendo uso de los microscopios de fluorescencia mencionados anteriormente se contó el número de pedestales formados en un total de 50-100 células por condición y por experimento en diferentes campos aleatorios representativos. En los experimentos en los que las células fueron transfectadas se contaron los pedestales formados en 20 células que expresaban la construcción en cada réplica del experimento.

14. Ensayos de *spreading* celular

Las células SYF y Rsrc se transfectaron durante 20 horas con las construcciones del sistema FIT en placas de 56 cm². A continuación, las células se tripsinizaron y se añadió inhibidor de tripsina *Glycine max* (Soybean T6522, Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,5 mg/ml en medio IMDM. Posteriormente, las células se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio IMDM al 10% de FBS. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer. Para llevar a cabo las inmunofluorescencias, se transfirieron $2,5 \cdot 10^5$ células de cada transfección a pocillos de 9,5 cm² con 4 cubres estériles previamente tratados con fibronectina de rata u oveja (Calbiochem, 30 µg/ml) durante 16 horas a 4 °C. A continuación, las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 1 hora, 2 horas y 3 horas. Seguidamente se fijaron con formalina y se realizaron IFIs, como se ha indicado anteriormente.

Para las IPs con células Rsrc y los ensayos PD con células HeLa o N-WASP/- se sembraron las células en placas de 145 cm² en ausencia de suero. Después de 24 horas, las células fueron tripsinizadas, seguidamente se añadió el inhibidor de tripsina *Glycine max* al 0,5 mg/ml en medio IMDM. A continuación, las células fueron centrifugadas y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio IMDM al 10% de FBS. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer. Para cada condición $2,5 \cdot 10^6$ células se transfirieron a placas de 145 cm² previamente tratadas con fibronectina de oveja a una concentración de 30 µg/ml y se incubaron a 37 °C y al 5% de CO₂ durante 1 hora y 3 horas. Posteriormente, las células se recogieron en 700 µl de RIPA haciendo uso de rascadores de plástico. Como control se dejaron $2,5 \cdot 10^6$ células en suspensión, las cuales se centrifugaron y el pellet se resuspendió en tampón de lisis RIPA.

Para los experimentos de co-inmunoprecipitación se sembraron células HeLa en placas de 145 cm² a una confluencia del 70-80%. Después de 24 horas las células fueron transfectadas con las construcciones del FIT durante 20 horas. A continuación las células

transfectadas se tripsinizaron, se lavaron una vez con el inhibidor de tripsina *Glycine max* y fueron resuspendidas en medio IMDM al 10% de FBS. A continuación fueron contadas como se ha mencionado anteriormente. Para realizar la co-inmunoprecipitación 1.10^6 células de cada transfección se transfirieron a placas de 56 cm² tratadas previamente con fibronectina de oveja a una concentración de 30 µg/ml durante 16 horas a 4 °C. Seguidamente las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C al 5% de CO₂, tras lo cual se recogieron en 150 µl tampón de lisis RIPA.

14.1 Análisis de las adhesiones focales

Los ensayos descritos a continuación fueron realizados en el Laboratorio del Dr. Christoph Ballestrem (University of Manchester, Reino Unido) durante la estancia corta.

Los fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3 se sembraron a un 70-80% de confluencia en placas de 6 pocillos y fueron co-tranfectados con GFP-talina *Full-length* (FL) y mCherry-vinculina880 durante 4 horas en medio sin suero. A continuación las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con 1% L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 10% de FCS (*Fetal Calf Serum*). A continuación, las células fueron transferidas a placas MatTek (*Glass Bottom Culture Dishes*), especiales para microscopía recubiertas con polyisina, las cuales habían sido previamente tratadas con fibronectina bovina a una concentración de 10 µg/ml, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas en las placas MatTek *over-night* a una temperatura de 37 °C, al 5% de CO₂ en una atmósfera al 95% de humedad. Posteriormente las células fueron fijadas con formalina y se conservaron a 4 °C en PBS hasta su utilización.

15. Tratamientos

15.1 Pervanadato

El pervanadato (PV) es un inhibidor de proteínas tirosina fosfatasas (Kadota, Fantus *et al.* 1987). El PV se preparó realizando una solución de Na₃VO₄ 1 mM y H₂O₂ al 1% (ambos de Sigma) en PBS. La solución se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con dicha solución diluida a la mitad en medio IMDM durante 30 minutos, a una temperatura de 37 °C, al 5% de CO₂ y en una atmósfera al 95% de humedad (Arkininstall, Payton *et al.* 1995). Finalmente, las células tratadas fueron recogidas en tampón de carga Laemli 2x y procesadas para su posterior análisis por WB.

15.2 *Trichostatin A*

El *Trichostatin A* (TSA; T1952, Sigma-Aldrich) es un metabolito de *Streptomyces sp.* que inhibe específicamente a las proteínas histona deacetilasas de la clase I, II y IV de mamíferos. La deacetilasa HDCA6, es la principal enzima que deacetila a cortactina y pertenece a la clase II de las HDACs. Por tanto, el tratamiento de las células con este reactivo impide la deacetilación de cortactina. La concentración de TSA aplicada fue de 400 ng/ml, resuspendido en DMSO (Zhang, Yuan *et al.* 2007) en los experimentos indicados. En este estudio, el TSA fue aplicado a las células en medio IMDM con FBS al 10% durante 16 horas y como control se añadió la cantidad correspondiente de DMSO a las células sin tratar.

15.3 PP2

El compuesto PP2 (4-Amino-3-(4-clorofenil)-1-(t-butil)-1H-pirazol [3,4-d]pirimidina) es un inhibidor selectivo de la familia de proteínas tirosina quinasas Src (Hanke, Gardner *et al.* 1996). Las células Rsrc se sembraron en placas de 145 cm² a una confluencia del 80%. Después de 24 horas, las células se tripsinizaron, se lavaron con el inhibidor de tripsina y se contaron. Para cada condición 2,5.10⁶ células se transfirieron a placas de 145 cm² previamente tratadas con fibronectina de oveja a una concentración de 30 µg/ml y se incubaron a 37 °C y al 5% de CO₂ durante 1 hora y 3 horas. Una tercera placa se incubó durante 1 hora a 37 °C con fibronectina, a continuación se añadió PP2 (Calbiochem) a una concentración de 10 µM y se incubó durante 2 horas más a 37 °C. Posteriormente las células se recogieron en 600 µl de RIPA haciendo uso de rascadores de plástico.

16. Infecciones con EPEC

Las células fueron crecidas a una confluencia de 70-80%. Las bacterias se cultivaron en medio LB durante 16 horas a 37 °C, con una frecuencia de agitación de 200 r.p.m. Para preactivar las bacterias, se realizó una dilución 1:100 del cultivo bacteriano en medio IMDM suplementado con FBS al 10% y se incubaron a 37 °C, al 5% de CO₂, en una atmósfera al 95% de humedad. La preactivación de las bacterias activa el sistema de secreción de tipo III. Las bacterias fueron preactivadas durante 2 horas, a continuación se midió la D.O. de la suspensión a 600 nm y se ajustó a una D.O. de 0,2. Se añadieron 12,5 µl de suspensión bacteriana a D.O. 0,2 por pocillo de 9,5 cm², indicado como X EPEC.

La Multiplicidad de Infección (MOI) es el número de bacterias añadidas al comienzo de la infección por célula. Para calcular la MOI, las bacterias fueron preactivadas durante 2 horas a partir de un cultivo *over-night*, como se ha mencionado anteriormente. A continuación se midió la D.O. de la suspensión a 600 nm y se ajustó a la D.O. de 0,2. La MOI

fue calculada efectuando ensayos de unidades formadoras de colonias. Para ello se realizaron diluciones seriadas por triplicado a partir de una dilución inicial de la suspensión bacteriana preactivada equivalente a X EPEC (12,5 µl de bacteria preactivada a D.O. 0,2). Además, para el cálculo de la MOI se contó el número de células HeLa que hay en una superficie de 9,5 cm² en el momento de la infección, aproximadamente 2.10⁵ células. Se determinó que X EPEC es equivalente a una MOI de 3-4 bacterias por célula. En los experimentos indicados las células se infectaron a MOIs superiores.

Las células fueron infectadas durante los tiempos indicados (1, 2 o 3 horas) en medio IMDM suplementado con el 10% de FBS, sin antibiótico, a 37 °C y al 5% de CO₂, en una atmósfera al 95% de humedad. Después de la infección las células fueron lavadas tres veces con D-PBS frío y recogidas en los tampones de lisis indicados. En paralelo las células se sembraron a un 70-80% de confluencia en placas de 6 pocillos, con cuatro cubreobjetos por pocillo previamente esterilizados, y una vez infectadas fueron fijadas como se indica en el apartado “Inmunofluorescencia indirecta y tinciones”.

17. Curva de fosforilación de CrkII y CrkL

Las células HeLa se sembraron a una confluencia del 80-90% en placas de 145 cm² en medio IMDM suplementado con FBS al 10%, durante 8 horas. Posteriormente, las células se lavaron una vez con medio IMDM sin suero y se incubaron en medio sin suero durante las 16 horas previas a la infección a una temperatura de 37 °C, al 5% de CO₂ y en una atmósfera al 95% de humedad. Asimismo, el cultivo de EPEC fue preactivado, como se ha mencionado anteriormente y se ajustó la D.O. a 0,2. A continuación, la suspensión de EPEC fue centrifugada a 1800 x g durante 5 min y el pellet fue resuspendido en medio IMDM sin suero. Seguidamente se llevó a cabo la infección de las células con EPEC a una MOI de 3 o 45. Las células fueron infectadas durante 1 hora, 2 horas y 3 horas o se dejaron sin infectar.

Las células se lavaron tres veces con D-PBS frío y se recogieron en 600 µl de tampón de lisis RIPA. A continuación las muestras fueron homogenizadas pasándolas 3 veces por una jeringa con una aguja de 25GA y se centrifugaron a 21000 x g durante 10 min a 4 °C, como se ha mencionado previamente. El sedimento se descartó y el sobrenadante fue utilizado para efectuar IPs con el anticuerpo anti-Crk BD o se le añadió tampón de carga Laemli y fue utilizado en geles SDS-PAGE y analizado por WB para la detección de fosfo-CrkL.

Para las inmunofluorescencias se realizó el mismo ensayo, con la excepción de que las células se sembraron a un 70-80% de confluencia en placas de 6 pocillos, con cuatro cubreobjetos por pocillo previamente esterilizados, y una vez infectadas a una MOI de 15

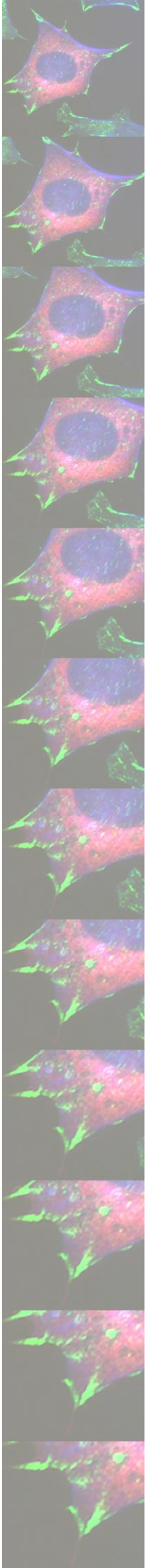
durante 2 horas y 3 horas, se lavaron tres veces con D-PBS a 4 °C y fueron fijadas como se ha mencionado previamente.

18. Análisis estadístico

Las bandas de los WBs fueron cuantificadas empleando la herramienta para la cuantificación de bandas del software Odyssey 3.0 y Odyssey Fc. El análisis estadístico y la representación gráfica se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism (versión 5.0). Para el análisis estadístico se emplearon los siguientes test: el test *t*-Student no paramétrico con dos colas (no asume una distribución gaussiana) en la parte I y en la parte II de los resultados; a excepción de las Figs. 31 y 32 en las que se empleó el test *t*-Student pareado con una cola (asume que los valores de cada columna son pares de observaciones) y en la Figs. 33 y 38 en la que se utilizó un análisis ANOVA de un factor y posterior test de Dunnett (usado para comparar diferentes muestras con el control). Las gráficas representan la media \pm SEM (*Standard Error of the Mean*) (Resultados, Parte I) o la media \pm SD (*Standard Deviation*) (Resultados, Parte II).

Nota: Todos los experimentos han sido realizados un mínimo de 3 veces con resultados similares.

RESULTADOS



RESULTADOS

Parte I: Estudio de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina y su efecto en el *spreading* celular

1. Puesta a punto del sistema *Functional Interaction Trap*

1.1 El sistema *Functional Interaction Trap*

Como se ha mencionado en la introducción, cortactina de ratón puede ser fosforilada en los residuos de tirosina 421, 466, 482 y 485 por la proteína tirosina quinasa Src (Huang, Liu *et al.* 1998). Para promover la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src de forma eficiente y específica hemos empleado un sistema denominado *Functional Interaction Trap* (FIT) (Fig. 11, dibujo esquemático) (Sharma, Antoku *et al.* 2003).

La construcción de la quinasa Src en el sistema FIT está fusionada a un dominio rico en residuos de leucina denominado ZipA y a la etiqueta HA en el extremo carboxilo terminal para facilitar su detección (ZipA-HAΔSrc). Por otro lado, cortactina en el sistema FIT está fusionada al dominio rico en residuos de leucina ZipB, complementario al dominio ZipA, y a la etiqueta Myc en el extremo amino terminal (ZipB-MycCortactina).

1.2 Análisis de la fosforilación de cortactina por la proteína tirosina quinasa Src

Para analizar la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina haciendo uso de las construcciones del sistema FIT se realizaron co-transfecciones en diferentes líneas celulares. Para ello se empleó una línea de fibroblastos embrionarios de ratón carente de las principales quinasas de la familia Src, denominada SYF. Asimismo, para confirmar el efecto del sistema FIT en presencia de la quinasa Src endógena, se llevaron a cabo dichas transfecciones en la línea de fibroblastos embrionarios de ratón SYF reconstituida con *c-Src*, denominada Rsrc. Además, estas líneas celulares expresan cortactina endógena.

Para promover una fosforilación eficiente de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src mediante el sistema FIT se efectuaron co-transfecciones empleando las construcciones ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (Fig. 11, co-transfección 5).

Como control del efecto de la transfección en las células se co-transfectaron los vectores vacíos fusionados únicamente a las etiquetas HA y Myc (Fig. 11, co-transfección 6). Para analizar si se produce fosforilación en residuos de tirosina de cortactina endógena por la transfección de la quinasa Src del sistema FIT se efectuaron transfecciones con la

construcción ZipA-HAΔSrc y HAΔSrc (Fig. 11, co-transfección 1 y 2). Además, como control de la fosforilación endógena de cortactina en residuos de tirosina se efectuaron transfecciones con ZipB-MycCortactina y MycCortactina (Fig. 11, co-transfección 3 y 7).

Por otra parte, para analizar los niveles de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src en ausencia del dominio ZipA se efectuaron co-transfecciones con la construcción HAΔSrc y ZipB-MycCortactina o MycCortactina (Fig. 11, co-transfecciones 4 y 8). Además, se dejaron células sin transfectar como control del nivel basal de fosforilación de cortactina en residuos de tirosina (Fig. 11, condición 9).

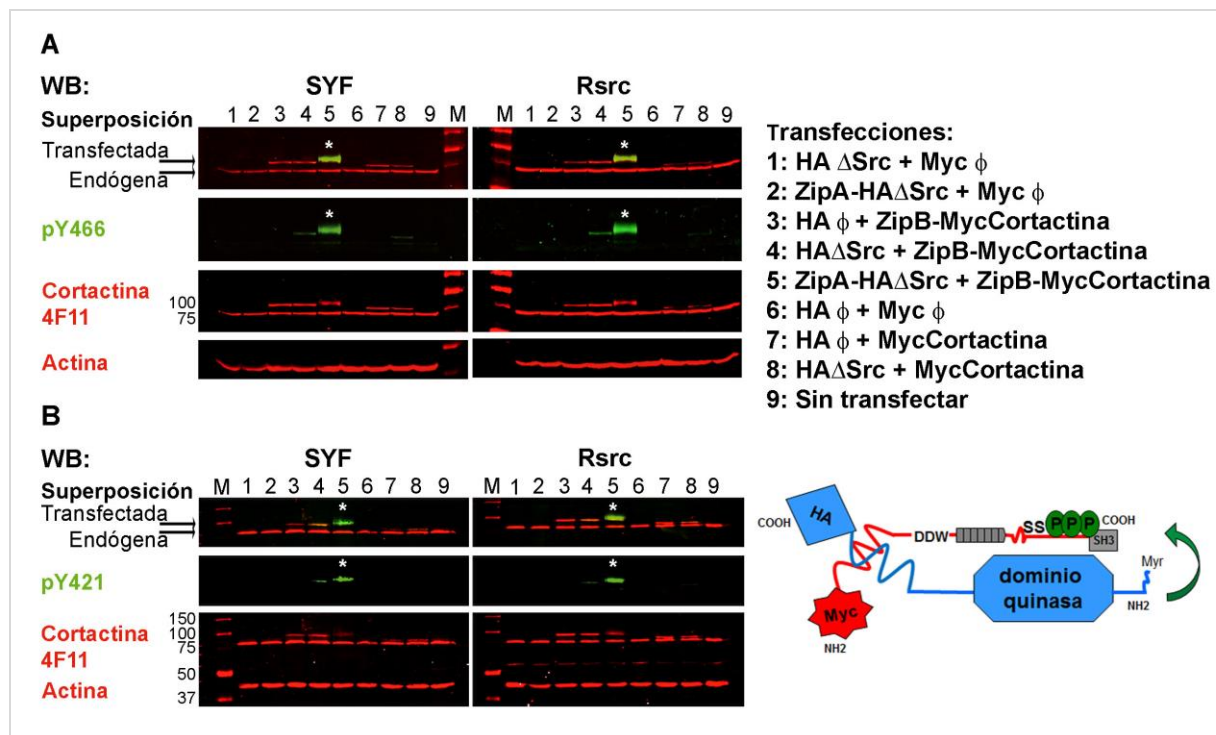


Figura 11. Cortactina es fosforilada eficientemente por la proteína tirosina quinasa Src en las células mediante el sistema *Functional Interaction Trap*. Las células SYF (carentes de las quinasas Src, Yes y Fyn) y las células SYF reconstituidas con *c-Src* (Rsrc) se transfectaron con diferentes combinaciones de vectores del sistema *Functional Interaction Trap* (FIT) (carriles del 1-8) o se dejaron sin transfectar (carril 9). **A)** Se realizó un análisis por *Western Blot* (WB) con anticuerpos fosfo-específicos policlonales que reconocen la fosforilación del residuo de tirosina 466 de cortactina (pY466, en verde) y **B)** la fosforilación del residuo de tirosina 421 de cortactina (pY421, en verde); y con el anticuerpo monoclonal de ratón (AcMo) anti-cortactina clon 4F11 (en rojo). Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-actina AcMo (en rojo). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios (anti-conejo y anti-ratón) conjugados a fluorocromos que se visualizaron con el escáner *Odyssey*. Se muestra la superposición de los anticuerpos (panel superior). El asterisco destaca la señal correspondiente a los anticuerpos policlonales anti-pY466 y anti-pY421 en la co-transfección 5 (ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina). El marcador de peso molecular se señala con una "M". En la parte inferior derecha se muestra una representación esquemática del sistema FIT. Las transfecciones fueron efectuadas por Narcisa Martínez Quiles. El procesamiento de los lisados celulares y el análisis por WB fue realizado por Eugenia Meiler.

Los lisados celulares fueron analizados mediante WB empleando el escáner *Odyssey*, el cual permite la detección de una misma proteína haciendo uso de varios anticuerpos de distinto origen de forma simultánea. En la presente tesis doctoral se ha usado el *Odyssey* para visualizar simultáneamente cortactina y cortactina fosforilada en residuos de tirosina (fosfo-cortactina).

Como se observa en la Fig. 11A y 11B, para detectar cortactina hemos empleado un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-cortactina 4F11 (en rojo). El anticuerpo anti-cortactina 4F11 reconoce un epítipo localizado en la quinta repetición de cortactina (van Rossum, de Graaf *et al.* 2003). Dicho anticuerpo es frecuentemente empleado para detectar cortactina mediante análisis por WB. Cortactina endógena puede ser detectada por WB como un doblete de 80-85 kDa, lo cual se observa más fácilmente en determinados tipos celulares y con el uso de anticuerpos policlonales, o como una única banda.

En nuestras condiciones experimentales (Fig. 11A y 11B), cortactina endógena es detectada por el anticuerpo 4F11 como una única banda de 85 kDa. Cortactina transfectada fusionada a la etiqueta Myc se detecta con una masa molecular de 90 kDa y cortactina fusionada a ZipB-Myc se detecta con una masa molecular de 100 kDa aproximadamente. Además, se trató de obtener niveles similares de expresión de cortactina endógena y cortactina transfectada.

Para detectar la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina se emplearon anticuerpos policlonales fosfo-específicos comerciales. Los anticuerpos fosfo-específicos empleados reconocen la fosforilación de cortactina en el residuo de tirosina 466 (pY466) o en el residuo de tirosina 421 (pY421). Como control de carga de los lisados celulares se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce actina.

El análisis por WB con los anticuerpos anti-pY466 y anti-pY421 muestra una señal intensa de fosforilación de cortactina en los residuos de tirosina 466 y 421 en los lisados de células co-transfectadas con ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (Fig. 11A y B, carril 5, asterisco).

Por el contrario, la señal de fosfo-cortactina es mucho menor en los lisados de células co-transfectadas en ausencia del dominio ZipA o de ambos dominios Zip (Fig. 11A y B, carril 4 y 8). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de cortactina y Src fusionadas a los dominios Zip complementarios incrementa los niveles de fosfo-cortactina (Fig. 11A y B, carril 5, asterisco).

Además, no se detecta fosforilación en residuos de tirosina de cortactina endógena al sobreexpresar la proteína tirosina quinasa Src del sistema FIT (Fig. 11A y B, carriles 1, 2, 4, 5

y 8). Tampoco se observa fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src endógena al sobreexpresar cortactina (Fig. 11A y B, carriles 3 y 7).

Por otro lado, se observan niveles similares de fosfo-cortactina en las líneas celulares SYF y Rsrc co-transfectadas con las construcciones ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (Fig. 11A y B, carril 5 de cada panel).

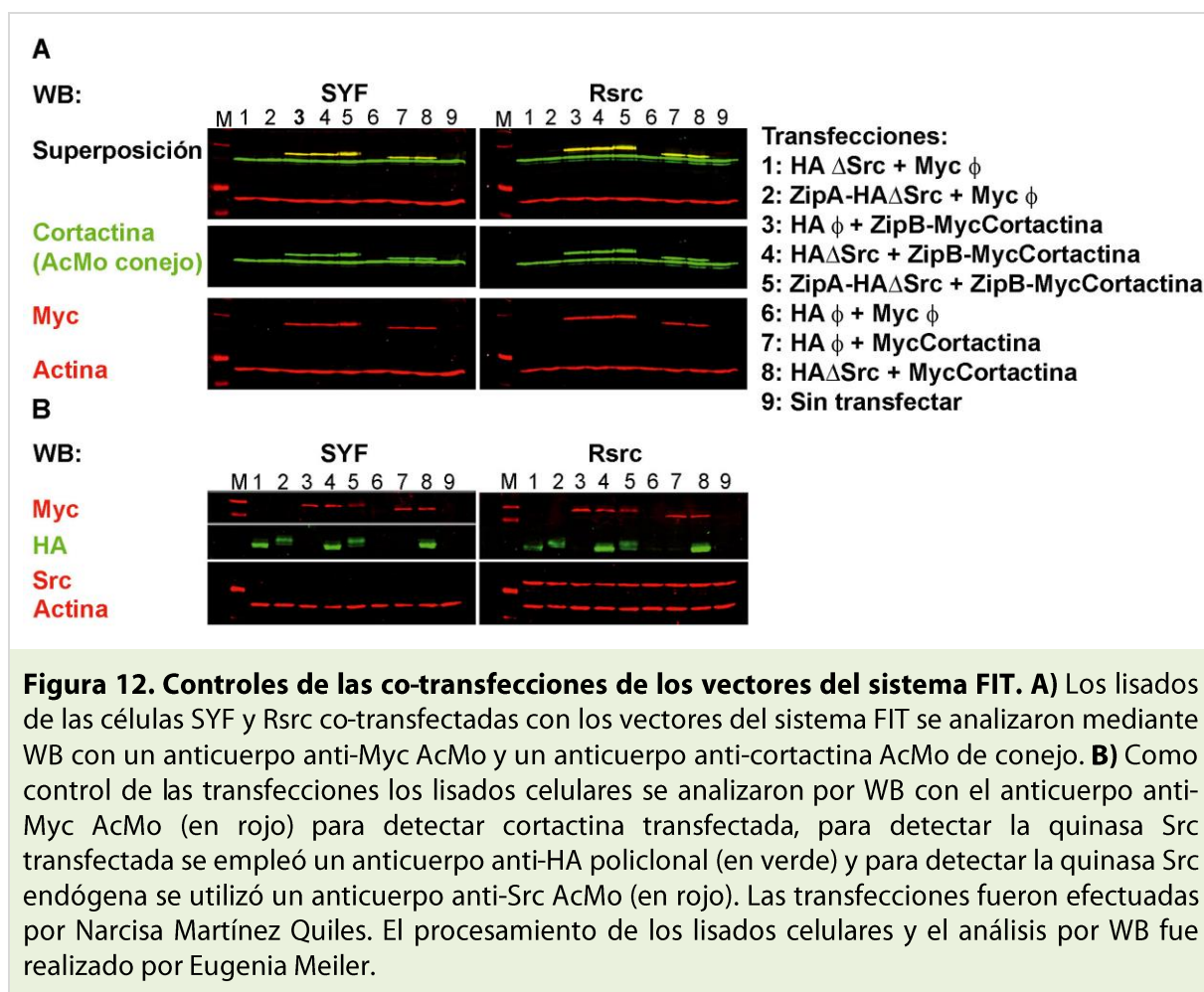
Para confirmar que cortactina transfectada es fosforilada por la quinasa Src mediante el sistema FIT se analizaron las superposiciones de las señales de los anticuerpos que reconocen cortactina y fosfo-cortactina. La banda superior reconocida por el anticuerpo anti-cortactina 4F11 corresponde a cortactina transfectada. Además, dicha banda se superpone con la señal de los anticuerpos pY421 y pY466 (Fig. 11A y B; panel superior, carril 5, asterisco). Por otra parte se observa que cortactina transfectada fosforilada en residuos de tirosina tiene una movilidad electroforética ligeramente menor que cortactina transfectada sin fosforilar.

Los resultados presentados en la Fig. 11 indican que el uso del sistema FIT en las células SYF y Rsrc permite una fosforilación eficiente de cortactina transfectada por la proteína tirosina quinasa Src, la cual ocurre al menos en los residuos de tirosina 421 y 466. En los experimentos posteriores se utilizó únicamente el anticuerpo anti-pY466, debido a que la intensidad de su señal de reconocimiento es mayor que la del anticuerpo anti-pY421.

1.3 Controles del sistema FIT

Para detectar específicamente cortactina transfectada, los lisados de células transfectadas con las construcciones del sistema FIT fueron analizados por WB con un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la etiqueta Myc y un anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce cortactina (Fig. 12A). Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina. Cortactina transfectada es reconocida de manera similar por el anticuerpo anti-Myc y el anticuerpo anti-cortactina, como se observa en la superposición de las señales de ambos anticuerpos.

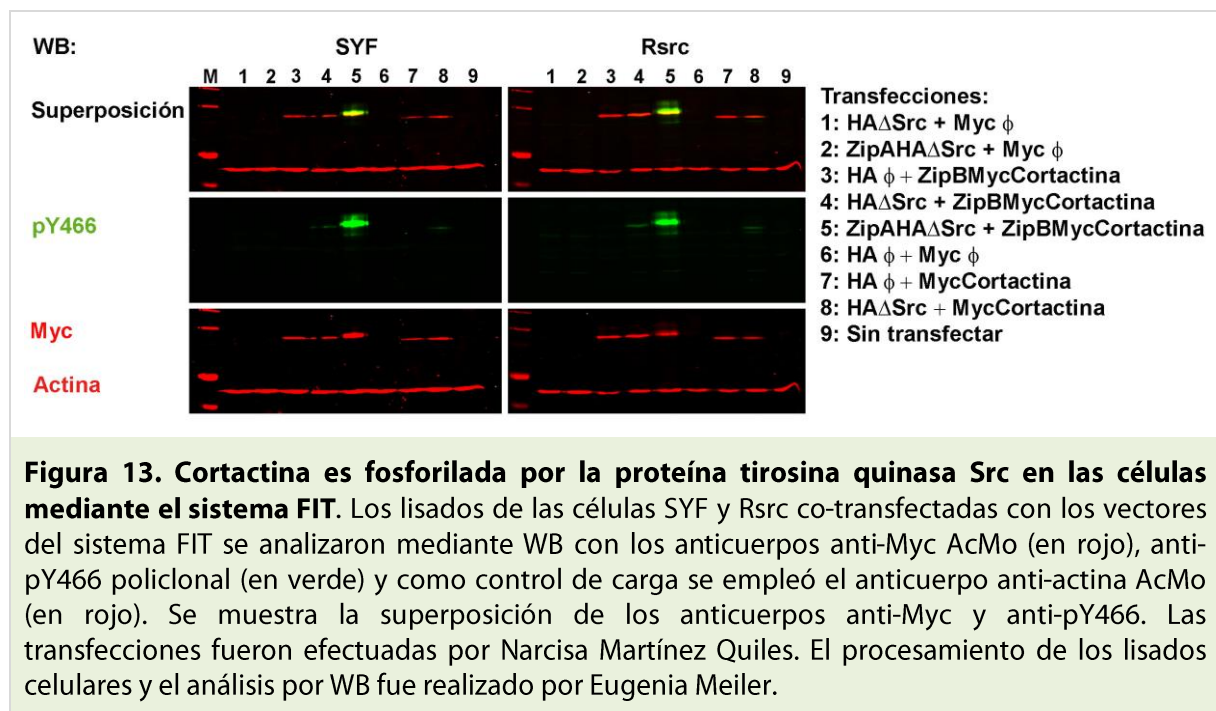
Por otra parte, para comprobar la expresión de la proteína tirosina quinasa Src del sistema FIT se realizó un análisis por WB con un anticuerpo policlonal que reconoce la etiqueta HA (Fig. 12B). Dicho anticuerpo detecta HAΔSrc (Fig. 12B, carriles: 1, 4 y 8) y ZipA-HAΔSrc (Fig. 12B, carriles: 2 y 5). Debido a la presencia del dominio Zip, la construcción ZipA-HAΔSrc presenta una masa molecular mayor que HAΔSrc.



Además, para detectar la expresión de cortactina con el sistema FIT en los lisados celulares se realizó un análisis por WB con el anticuerpo anti-Myc y como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-actina (Fig. 12B).

Para comprobar el fenotipo de las células SYF y Rsrc se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la proteína tirosina quinasa Src. Dicho anticuerpo detecta exclusivamente la quinasa Src endógena, ya que reconoce un epítipo localizado en el dominio SH2, el cual ha sido eliminado en las construcciones del sistema FIT. Como se puede observar en la Fig. 12B, en las células Rsrc se detecta la quinasa Src endógena, mientras que en las células SYF no se detecta dicha quinasa.

Para confirmar que cortactina transfectada es fosforilada en residuos de tirosina mediante el sistema FIT se efectuó un análisis por WB con el anticuerpo anti-Myc que reconoce específicamente cortactina transfectada y con el anticuerpo anti-pY466 que reconoce fosfo-cortactina (Fig. 13). Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina.



Como se puede observar en la superposición de los anticuerpos de la Fig. 13, la banda del anticuerpo anti-Myc coincide con la del anticuerpo anti-pY466 en los lisados de la co-transfección de ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (Fig. 13, carril 5). Esto confirma que cortactina transfectada es fosforilada en residuos de tirosina por la quinasa Src mediante el sistema FIT.

2. Control de especificidad del sistema FIT

2.1 Análisis por *Western Blot* con un anticuerpo anti-fosfotirosina genérico

Con el objetivo de determinar si cortactina es el principal sustrato fosforilado por la quinasa Src en células transfectadas con las construcciones del sistema FIT se realizó un análisis de la fosforilación en residuos de tirosina de todas las proteínas celulares.

Para ello se efectuaron co-transfecciones en las líneas celulares SYF y Rsrc con diferentes combinaciones de vectores del sistema FIT, como se ha mencionado anteriormente. Posteriormente se efectuó el análisis por WB con un anticuerpo compuesto por la mezcla de dos anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas de manera genérica (p-Tyr) y con el anticuerpo anti-cortactina monoclonal de conejo. En la Fig. 14 se muestra la superposición de estos anticuerpos. Los lisados de las células co-transfectadas con ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina presentan una intensa señal de fosforilación en residuos de tirosina, que se superpone con la señal del anticuerpo anti-cortactina (Fig. 14, carril 5; asterisco). En las

células SYF y Rsrc se observan resultados similares en cuanto a los niveles de fosfo-cortactina haciendo uso del sistema FIT.

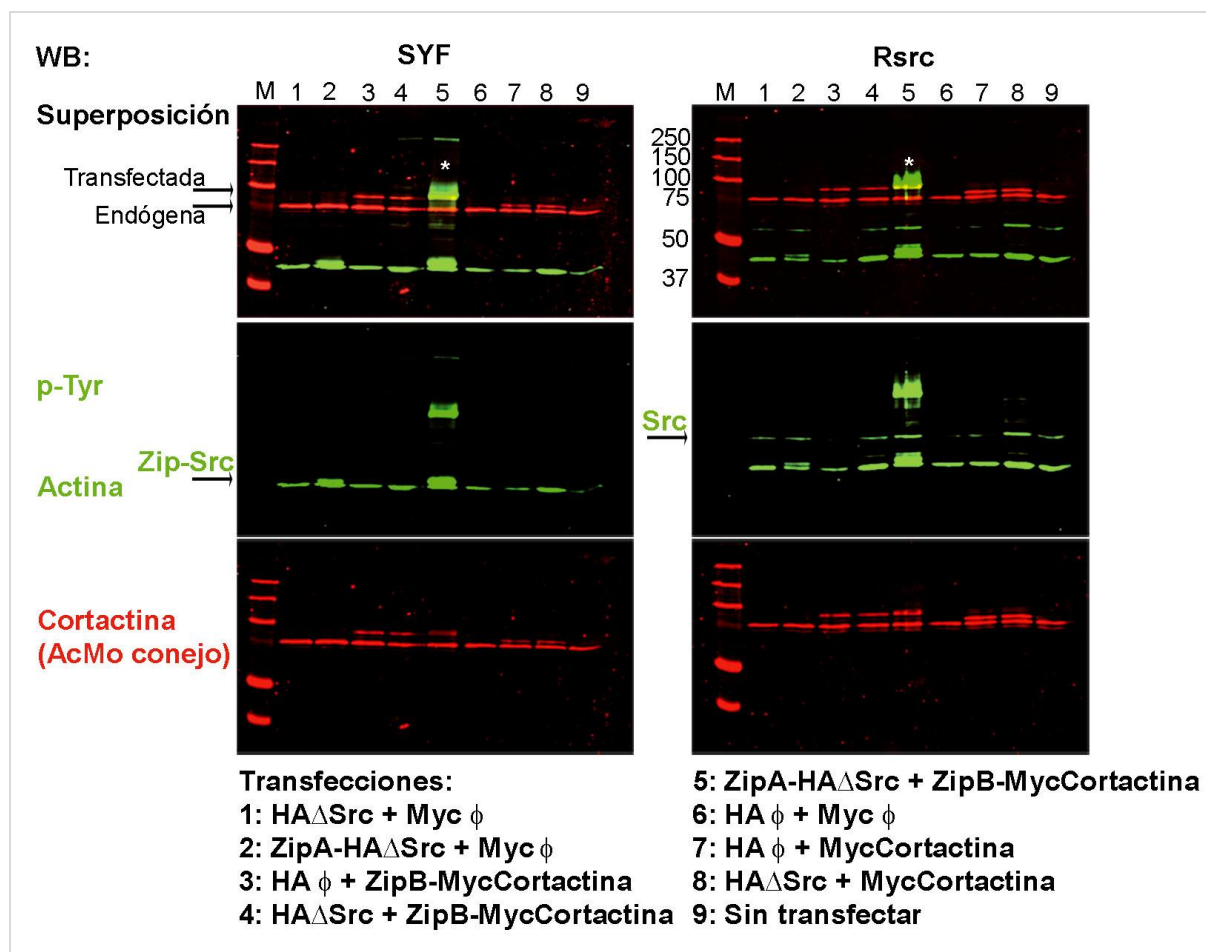


Figura 14. Especificidad de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina usando el sistema FIT. Las células SYF y Rsrc se transfectaron con diferentes combinaciones de vectores del sistema FIT (carriles del 1-8) o se dejaron sin transfectar (carril 9). Se efectuó el análisis por WB de los lisados con un anticuerpo anti-fosfotirosinas genérico AcMo (p-Tyr, en verde) y con el anticuerpo anti-cortactina AcMo de conejo para detectar cortactina (en rojo). Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina AcMo (en verde). Se señala con flechas cortactina transfectada y endógena, así como ZipA-HAΔSrc y la quinasa Src endógena. El asterisco destaca la superposición de las señales de los anticuerpos anti-p-Tyr y anti-cortactina en la co-transfección ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (carril 5). Las transfecciones fueron realizadas por Narcisa Martínez Quiles. El procesamiento de los lisados celulares y el análisis por WB fue realizado por Eugenia Meiler.

Además, con el anticuerpo anti-p-Tyr se observa una banda de masa molecular ligeramente superior a actina que corresponde a ZipA-HAΔSrc (Fig. 14, flecha carriles: 2 y 5). Esto se debe a que la proteína tirosina quinasa Src es autofosforilada en el residuo de tirosina 416 en su conformación activa (Smart, Oppermann *et al.* 1981). Asimismo, en las células Rsrc se detecta la fosforilación de la quinasa c-Src (60 kDa). Sin embargo, no se

observa fosforilación en residuos de tirosina de otras proteínas, lo cual indica el grado de especificidad del sistema.

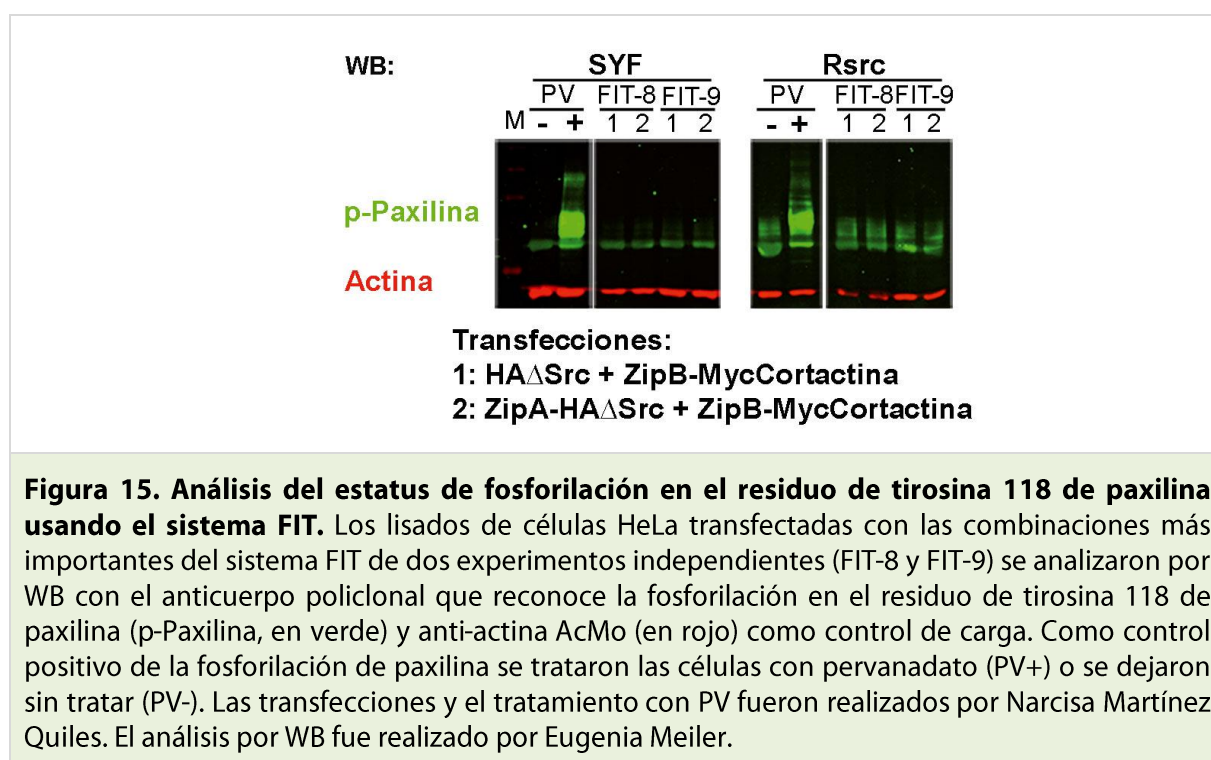
Estos resultados demuestran que cortactina fusionada al dominio ZipB es la principal proteína fosforilada en residuos de tirosina por la proteína de fusión ZipA-HA Δ Src en los lisados de las células transfectadas con el sistema FIT (Fig. 14, carril 5).

2.2 Control de especificidad de sustrato de la quinasa Src usando el sistema FIT

En el sistema FIT, la proteína tirosina quinasa Src carece de los dominios SH2 y SH3, por los cuales se une a sus sustratos. Por tanto, la quinasa Src del sistema FIT es capaz de unirse a cortactina principalmente a través de los dominios Zip.

Para determinar si la proteína tirosina quinasa Src del sistema FIT fosforila específicamente a cortactina se analizó el estatus de fosforilación de la proteína paxilina, la cual es otro de los sustratos de la quinasa Src (Weng, Taylor *et al.* 1993). Para ello se efectuaron co-transfecciones con las construcciones de la quinasa Src y cortactina del sistema FIT (ambas con sus dominios Zip o únicamente con el dominio ZipB) en las líneas celulares SYF y Rsrc (Fig. 15).

El pervanadato (PV) es un potente inhibidor de las proteínas tirosina fosfatasas, el cual potencia fuertemente la fosforilación en residuos de tirosina (Kadota, Fantus *et al.* 1987). Las células SYF y Rsrc sin transfectar fueron tratadas con pervanadato como control positivo de la fosforilación de paxilina.



A continuación, se realizó un análisis por WB con un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente la fosforilación en el residuo de tirosina 118 de paxilina, el cual es susceptible de ser fosforilado por la quinasa Src (Schaller and Parsons 1995).

Como se muestra en la Fig. 15, se observa una potente fosforilación de paxilina al tratar las células con pervanadato, mientras que los lisados sin tratamiento presentan unos niveles de fosforilación de paxilina basales. Las células Rsrc presentan unos niveles basales de fosfo-paxilina mayores que los observados en las células SYF, lo cual se debe a la fosforilación de paxilina por la quinasa Src endógena en las células Rsrc.

Por otra parte, los lisados de células transfectadas con el sistema FIT, de los cuales se muestran dos experimentos independientes (FIT8 y FIT9), presentan unos niveles de fosforilación de paxilina similares a los niveles basales. Estos resultados indican que la proteína tirosina quinasa Src del sistema FIT no es capaz de fosforilar a paxilina, que es otro de los sustratos de la proteína tirosina quinasa Src endógena.

2.3 Especificidad de la fosforilación de cortactina mediante el sistema FIT

Como se ha mencionado anteriormente, la quinasa Src fosforila a cortactina de ratón principalmente en los residuos de tirosina 421, 466 y 482 (Huang, Liu *et al.* 1998). Para comprobar que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src mediante el sistema FIT se produce en los residuos de tirosina descritos, se generó un triple mutante de cortactina no fosforilable en dichas posiciones (cortactina 3F), el cual había sido previamente usado por nuestro grupo (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004). Para ello, en las posiciones 421, 466 y 482 se efectuaron mutaciones puntuales por mutagénesis dirigida que sustituyen los residuos de tirosina por residuos de fenilalanina, los cuales no puede ser fosforilados. Posteriormente, dicho mutante se ligó a un vector ZipB-Myc vacío.

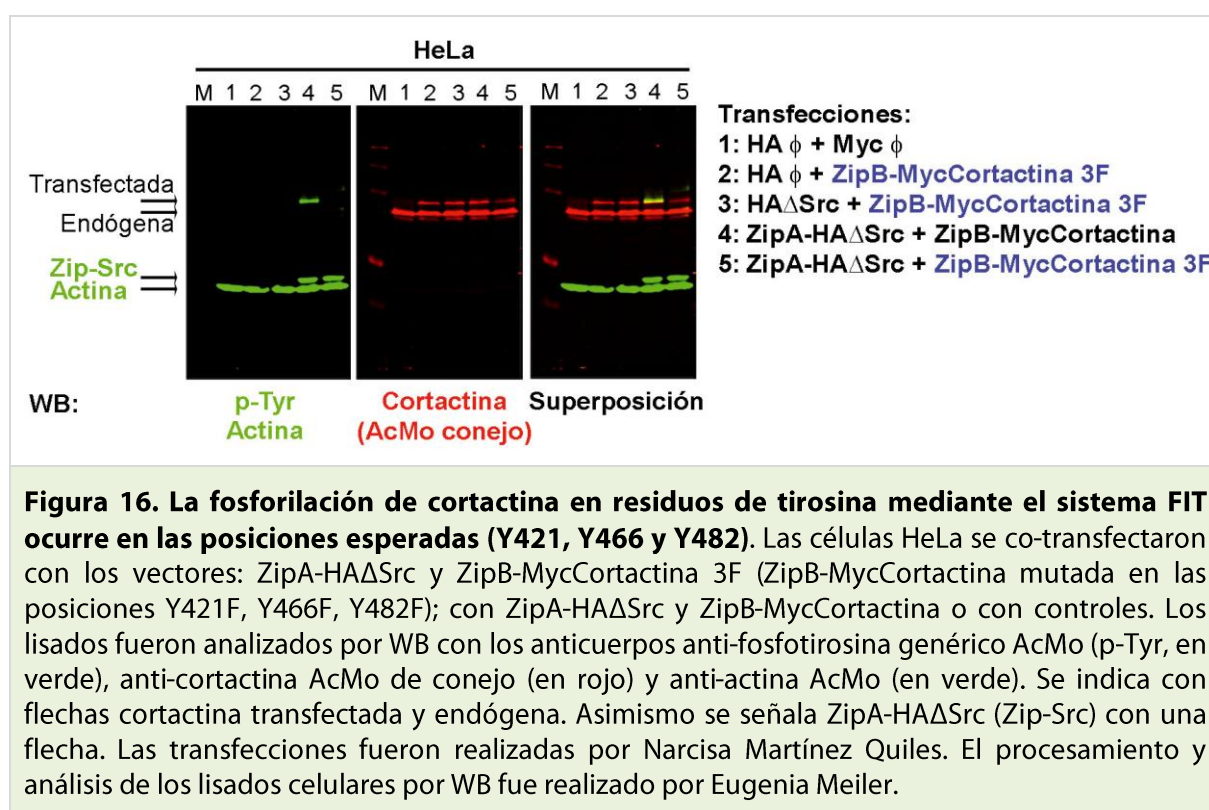
A continuación, se llevaron a cabo co-transfecciones con los vectores del FIT en la línea celular HeLa. Se eligió esta línea celular por ser usada más ampliamente en investigación celular y de manejo más fácil que las células SYF y Rsrc.

Para analizar la fosforilación en residuos de tirosina del triple mutante no fosforilable de cortactina se efectuaron co-transfecciones en las células HeLa con los vectores: HA vacío y ZipB-MycCortactina 3F, HAΔSrc y ZipB-MycCortactina 3F, así como ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina 3F.

Como control positivo de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina se co-transfectaron los vectores ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina. Además, como control de la transfección, se co-transfectaron los vectores vacíos fusionados a las etiquetas HA y Myc.

Posteriormente, se efectuaron análisis por WB de los lisados celulares con el anticuerpo anti-fosfotirosinas genérico, que reconoce proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, y con el anticuerpo anti-cortactina (Fig. 16).

Como se muestra en la Fig. 16, no se observa fosforilación del triple mutante de cortactina en residuos de tirosina en los lisados de células co-transfectadas con ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina 3F (Fig. 16, carril 5), y tampoco en los lisados de células en las que se co-transfectaron las construcciones HAΔSrc y ZipB-MycCortactina 3F (Fig. 16, carril 3). Estos resultados confirman que la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina por la tirosina quinasa Src mediante el FIT ocurre mayoritariamente en las posiciones esperadas.



3. Análisis de la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina mediante el sistema FIT en células HeLa

3.1 Análisis de cortactina

Como se ha mencionado en la introducción, la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina ocurren en residuos aminoacídicos diferentes y regiones distintas de la molécula de cortactina. Sin embargo ambas modificaciones post-traduccionales provocan una disminución de la unión de actina-F en la zona de las repeticiones (Huang, Ni *et al.* 1997; Zhang, Yuan *et al.* 2007). Esto nos indujo a pensar que la

fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina podrían estar relacionadas. Por tanto, nos centramos en determinar si existía una relación entre dichas modificaciones post-traduccionales.

La regulación por acetilación/deacetilación de cortactina fue descrita por primera vez en las células HeLa (Zhang, Yuan *et al.* 2007). Por tanto, para analizar la relación entre la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina se empleó dicha línea celular.

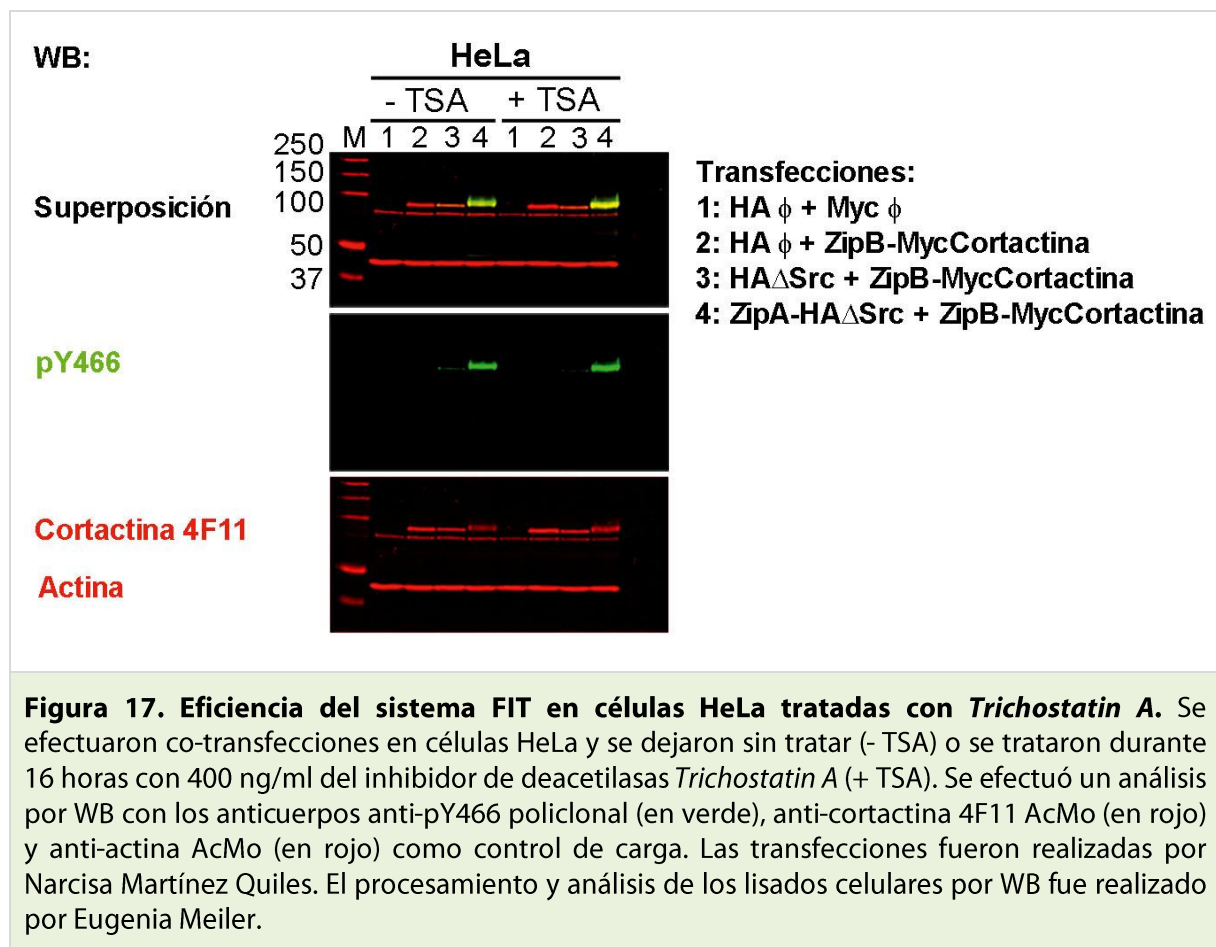
Además, la línea celular HeLa es adecuada para el empleo del sistema FIT, debido a que presenta unos niveles basales de cortactina fosforilada en residuos de tirosina indetectables mediante análisis por WB en nuestras condiciones experimentales (Fig. 17).

Como se muestra en la Fig. 17, se llevaron a cabo co-transfecciones en las células HeLa con las construcciones del sistema FIT: vectores vacíos (carril 1), HA vacío y ZipB-MycCortactina (carril 2), HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (carril 3), así como ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (carril 4).

Además se potenció la acetilación de las células con un inhibidor de deacetilasas, *Trichostatin A* (TSA), el cual bloquea la deacetilación de cortactina (Zhang, Yuan *et al.* 2007) y como control se usaron células transfectadas sin tratar. Los lisados de las células HeLa transfectadas se analizaron por WB para confirmar la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina. Para ello se emplearon los anticuerpos anti-pY466 y anti-cortactina 4F11. Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina (Fig. 17).

En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente (Fig. 11), cortactina es eficientemente fosforilada en residuos de tirosina cuando se co-transfecta ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina en las células HeLa (Fig. 17, carril 4). Mientras que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src del sistema FIT es mucho menor en ausencia del dominio ZipA (Fig. 17, carril 3). Estos resultados corroboran la eficiencia de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosinas por la quinasa Src mediante el sistema FIT, en células HeLa tratadas con TSA y sin tratar.

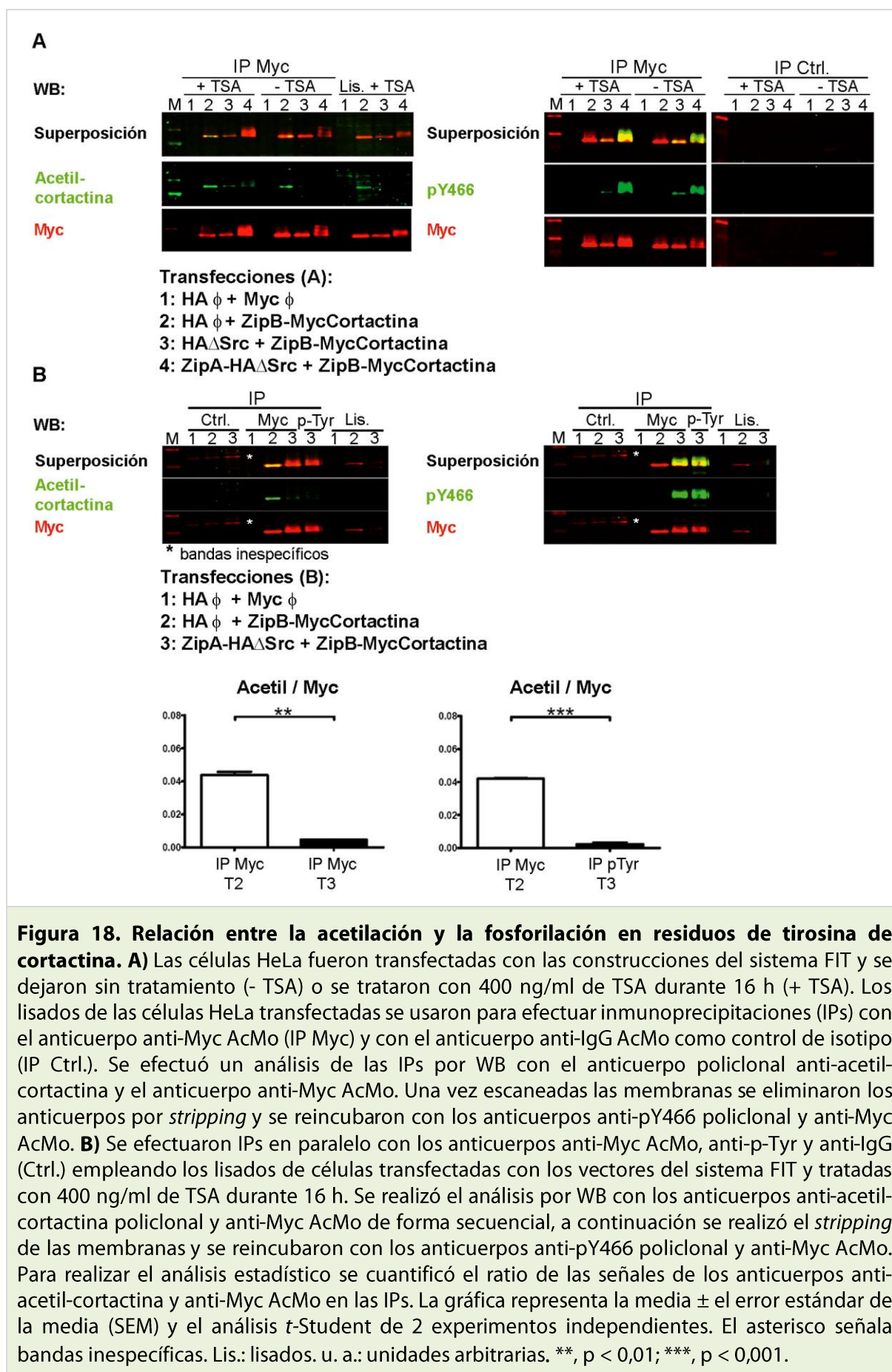
Para determinar si cortactina puede estar fosforilada en residuos de tirosina y acetilada simultáneamente se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones (IPs) empleando los lisados de células HeLa transfectadas, previamente analizados por WB (Fig. 17). Las IPs se efectuaron con el anticuerpo anti-Myc monoclonal de ratón y como control de isotipo, en paralelo se realizaron IPs con un anticuerpo anti-IgG monoclonal de ratón.



Las IPs fueron analizadas por WB con el anticuerpo anti-Myc. El análisis por WB de las IPs revela que cortactina es eficientemente inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Myc en los lisados en los que se transfecta cortactina (Fig. 18 co-transfecciones 2, 3 y 4).

Por otro lado, no se observa inmunoprecipitado de cortactina con el anticuerpo anti-Myc en los lisados de células transfectadas con los vectores vacíos (Fig. 18A, carril 1 del panel IP Myc). Tampoco se detecta inmunoprecipitado de cortactina con el control de isotipo. Esto demuestra que la IP con el anticuerpo anti-Myc es específica e inmunoprecipita únicamente Myc-cortactina (Fig. 18A, panel derecho, IP Control).

Para detectar la acetilación de cortactina en las IPs se realizó un análisis por WB empleando un anticuerpo policlonal específico que reconoce acetil-cortactina (Fig. 18A, panel izquierdo IP Myc). El análisis por WB con el anticuerpo anti-acetil-cortactina muestra que ZipB-MycCortactina está acetilada principalmente en ausencia de ZipA-HA Δ Src, en los lisados de células tratadas con TSA y sin tratamiento (Fig. 18A, panel izquierdo, carril 2). Sin embargo, los niveles de acetilación de ZipB-MycCortactina son mucho menores cuando cortactina está fosforilada en residuos de tirosina por la quinasa ZipA-HA Δ Src (Fig. 18A, panel izquierdo, carriles 3 y 4).



El tratamiento con TSA incrementa sensiblemente los niveles de cortactina acetilada con respecto a los niveles basales, lo que indica que dicho tratamiento impide la deacetilación de cortactina, como había sido descrito previamente (Zhang, Yuan *et al.* 2007) y Fig. 18).

Para confirmar el nivel de fosforilación en las IPs analizadas por WB se eliminaron los anticuerpos de las membranas mediante *stripping*, haciendo uso de un tampón comercial. Una vez comprobado que la señal del anticuerpo anti-acetil-cortactina se había eliminado, las membranas fueron reincubadas con los anticuerpos anti-pY466 y anti-Myc (Fig. 18A, panel derecho, IP Myc).

El análisis por WB muestra que cortactina está fosforilada en residuos de tirosina principalmente en las IPs en las que se emplearon los lisados de las células co-transfectadas con las construcciones ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (Fig. 18A, panel derecho, IP Myc carril 4). Además, se observa que la señal de acetilación es prácticamente nula cuando cortactina está eficientemente fosforilada en residuos de tirosina (Fig. 18A, panel izquierdo, IP Myc carril 4). Estos resultados sugieren que la acetilación y la fosforilación en residuos de tirosina no ocurren simultáneamente en la misma molécula de cortactina.

3.2 Análisis de cortactina fosforilada en residuos de tirosina

Para confirmar la relación inversa entre la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina se realizaron IPs en paralelo usando el anticuerpo anti-Myc y el anticuerpo anti-fosfotirosina genérico, que reconoce proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (Fig. 18B).

Para simplificar el experimento se transfectaron células HeLa con los vectores vacíos (Fig. 18B, carril 1). Además, se transfectó cortactina (Fig. 18B, carril 2) o cortactina y la proteína tirosina quinasa Src, ambas fusionadas a los dominios Zip del sistema FIT (Fig. 18B, carril 3). Para prevenir la deacetilación de cortactina, las células fueron tratadas con TSA.

Los lisados de las células co-transfectadas con las construcciones del FIT se emplearon para efectuar IPs con el anticuerpo anti-Myc (Fig. 18B, IP Myc carriles 1, 2 y 3). En paralelo, como control de isotipo de las IPs se usó el anticuerpo anti-IgG. La IP con el anticuerpo anti-p-Tyr se efectuó únicamente en el lisado de las células co-transfectadas con ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (co-transfección 3), en el cual cortactina está fosforilada en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src (Fig. 18B, IP p-Tyr carril 3).

Como control de las IPs se efectuó el análisis por WB con el anticuerpo anti-Myc. Dicho análisis muestra que cortactina es eficientemente inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Myc en los lisados en los que se sobreexpresa ZipB-MycCortactina (co-transfecciones 2 y 3). Mientras que no se observa inmunoprecipitado en los lisados de células transfectadas con los vectores vacíos. Tampoco se observa señal en la IP con el control de isotipo (Ctrl.). Estos datos demuestran que la IP con el anticuerpo anti-Myc es específica.

Para analizar los niveles de acetilación de cortactina en las IPs se efectuaron análisis por WB con el anticuerpo anti-acetil-cortactina. En las IPs con el anticuerpo Myc se observa una señal intensa de acetilación de cortactina únicamente en el inmunoprecipitado en el que no se detecta señal de fosfo-cortactina (Fig. 18B, IP Myc carril 2).

Por el contrario se observa una señal leve de acetilación cuando cortactina está fosforilada en residuos de tirosina (Fig. 18B, panel izquierdo, IP Myc carril 3). Este resultado indica que la IP con el anticuerpo anti-Myc empleando el lisado en el que se sobreexpresa fosfo-cortactina contiene principalmente cortactina fosforilada en residuos de tirosina y una pequeña fracción que está acetilada y probablemente no está fosforilada. Por otro lado, en la IP efectuada con el anticuerpo p-Tyr en la que se inmunoprecipita exclusivamente fosfo-cortactina no se observa acetilación (Fig. 18B, panel izquierdo, IP p-Tyr carril 3).

El análisis estadístico de la cuantificación de dos experimentos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas en las señales de acetilación comparando las IPs de cortactina sin fosforilar y de fosfo-cortactina (Fig. 18B, gráfica). Estos datos confirman que cuando cortactina está fosforilada en residuos de tirosina no está acetilada.

Además, observamos que cortactina está acetilada aunque no se detecte su fosforilación (Fig. 18, carril 2). Por tanto la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina no parece ser necesaria para que cortactina sea acetilada.

En resumen, estos datos indican una disminución de la acetilación de cortactina cuando se promueve su fosforilación en residuos de tirosina (Fig. 18A carril 4, B carril 3). Por tanto, hemos observado que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la proteína tirosina quinasa Src parece competir con su acetilación.

3.3 Análisis de cortactina fosforilada en el residuo de tirosina 466

Para verificar la relación entre la acetilación y la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina con un anticuerpo fosfo-específico, se efectuaron IPs con el anticuerpo anti-

anticuerpos anti-pY466 y anti-cortactina 4F11 (Fig. 19, IP pY466, carril 3). Como se muestra en la Fig. 19, cortactina está fosforilada en residuos de tirosina en la IP con el anticuerpo anti-pY466 empleando el lisado de células HeLa transfectadas con ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina.

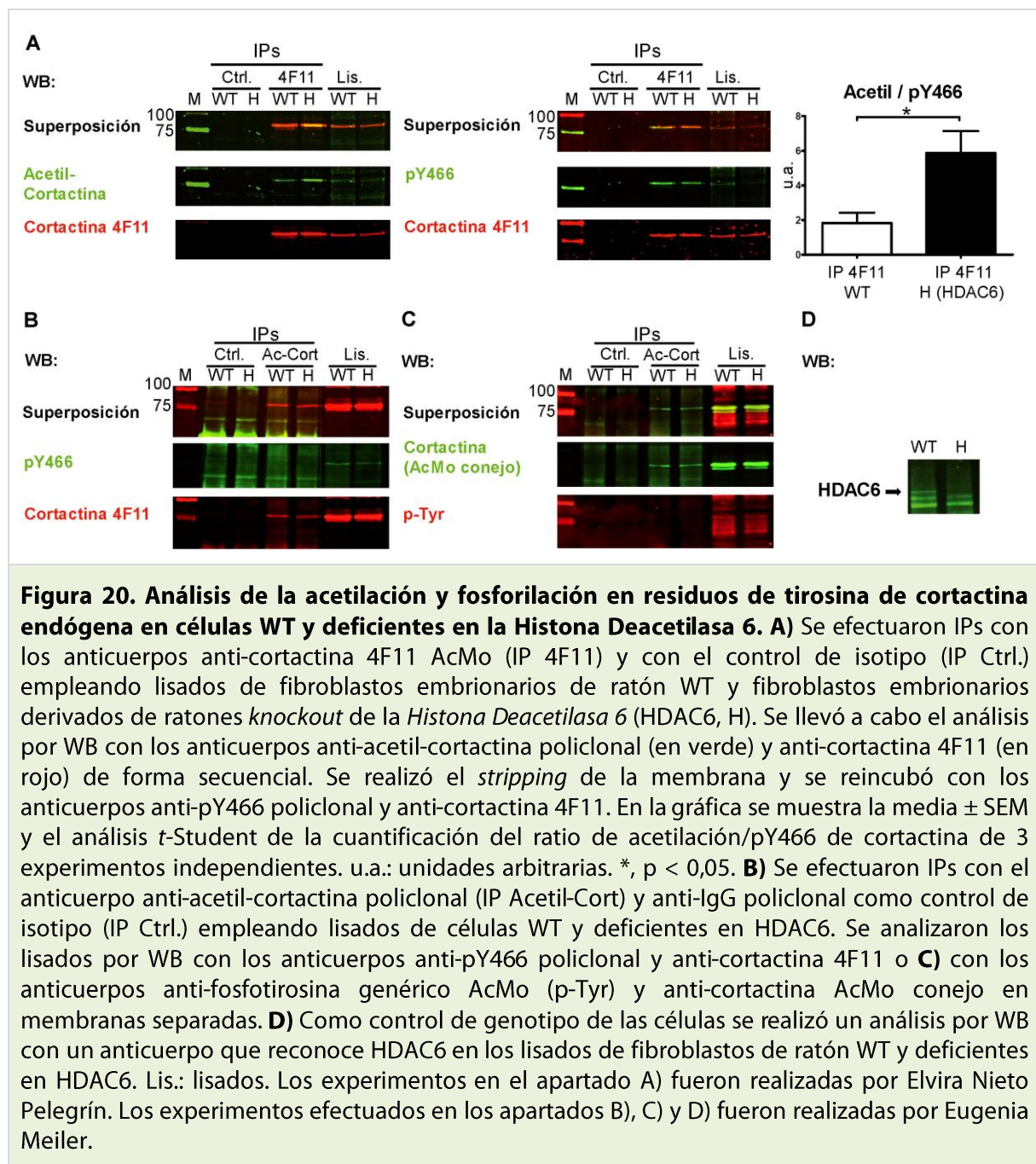
Estos resultados parecen indicar que la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina no pueden ocurrir simultáneamente en la misma molécula de cortactina, al menos en la mayoría de las moléculas, lo cual sugiere un mecanismo de competición entre ambas modificaciones post-traduccionales.

4. Análisis de la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina endógena en células WT y deficientes en HDAC6

En los experimentos previos se ha demostrado que existe una relación de competición entre la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina transfectada (Figs. 18-19). Para determinar si la relación entre estas modificaciones post-traduccionales es la misma en cortactina endógena, se analizaron sus niveles endógenos de acetilación y fosforilación en residuos de tirosina (Fig. 20). Para ello se usaron las líneas celulares de fibroblastos embrionarios WT y derivados de ratones *knockout* de *HDAC6* (*Histona Deacetilasa 6*). El análisis por WB de estas líneas celulares permite comprobar si la ausencia de la enzima HDAC6, que es una de las principales enzimas que deacetila cortactina en las células (Zhang, Yuan *et al.* 2007), afecta a los niveles de acetilación/fosforilación de cortactina.

El fenotipo de las células WT y deficientes en HDAC6 fue comprobado mediante WB con un anticuerpo que reconoce la deacetilasa HDAC6 (Fig. 20D). Para analizar los niveles de acetilación/fosforilación de cortactina se efectuaron IPs con el anticuerpo anti-cortactina 4F11 empleando los lisados de células WT y deficientes en HDAC6. Como control de isotipo de las IPs se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón. Posteriormente se efectuó el análisis de las IPs por WB con los anticuerpos anti-acetil-cortactina y anti-cortactina 4F11 (Fig. 20A). A continuación se efectuó un *stripping* para eliminar los anticuerpos y se reincubó la membrana con los anticuerpos anti-pY466 y anti-cortactina 4F11 (Fig. 20A).

El análisis estadístico de las cuantificaciones del ratio de las señales de acetilación/pY466 de cortactina en tres experimentos independientes (Fig. 20A, gráfica), muestra que las células deficientes en HDAC6 presentan un incremento significativo en el ratio de acetilación/pY466 de cortactina con respecto a las WT.



Para confirmar la relación de competición entre la acetilación y fosforilación en residuos de tirosina de cortactina endógena se llevaron a cabo IPs con el anticuerpo anti-acetil-cortactina y con anti-IgG de conejo como control de isotipo.

Posteriormente las IPs se analizaron por WB con los anticuerpos anti-pY466 y anti-cortactina 4F11. El análisis por WB muestra que cortactina es inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-acetil-cortactina (Fig. 20B). En la IP con el control de isotipo no se observa cortactina, por tanto la IP con el anticuerpo anti-acetil-cortactina es específica. Además, en las IPs con el anticuerpo anti-acetil-cortactina no se observa fosfo-cortactina empleando el anticuerpo anti-pY466 (Fig. 20B). Asimismo se efectuó el análisis por WB con los

anticuerpos anti-fosfotirosina genérico y anti-cortactina (Fig. 20C). El análisis por WB con estos anticuerpos muestra resultados similares a los obtenidos con los anticuerpos anti-cortactina 4F11 y anti-pY466.

En resumen, estos resultados indican que los fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en la deacetilasa HDAC6 presentan niveles mayores de cortactina acetilada que de cortactina fosforilada en residuos de tirosina con respecto a las células WT. Además, estos datos sugieren que la fracción mayoritaria de cortactina endógena acetilada no está fosforilada en residuos de tirosina de forma simultánea en las células WT y en las células deficientes en HDAC6.

5. Análisis de la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina endógena en células SYF y Rsrc.

A continuación, se analizaron los niveles basales de acetilación de cortactina en las líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón SYF y Rsrc. Dicho análisis se efectuó en estas líneas celulares debido a que presentan niveles diferentes de fosforilación de cortactina en residuos de tirosina ((Sharma and Mayer 2008) y Fig. 21).

Los lisados de células SYF y Rsrc se emplearon para efectuar IPs de cortactina con el anticuerpo anti-cortactina 4F11. En paralelo se efectuaron IPs con el anticuerpo anti-p-Tyr genérico, que reconoce proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, y como control de isotipo se usó el anticuerpo anti-IgG.

Posteriormente, se realizó el análisis por WB con el anticuerpo anti-acetil-cortactina. Seguidamente se efectuó un *stripping* y se reincubó con el anticuerpo anti-pY466. A continuación se efectuó un segundo *stripping* para eliminar el anticuerpo anti-pY466 y finalmente se reincubó la membrana con el anticuerpo anti-cortactina (Fig. 21A).

Como se observa en la Fig. 21A, cortactina fue eficientemente inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-cortactina 4F11 en los lisados de células Rsrc y SYF. Mientras que fosfo-cortactina fue inmunoprecipitada con los anticuerpos anti-cortactina 4F11 y con anti-p-Tyr únicamente en las células Rsrc. Las células SYF presentan niveles indetectables de fosforilación en residuos de tirosina, debido a que carecen de las principales quinasas de la familia Src, por tanto no se observa IP con p-Tyr en este tipo celular. En la IP con el control de isotipo no se detecta cortactina, lo cual confirma la especificidad de la IP empleando los anticuerpos anti-cortactina 4F11 y anti-pTyr.

Por otro lado, el análisis de las IPs por WB con el anticuerpo anti-acetil-cortactina muestra que cortactina está acetilada en las células SYF y Rsrc. Mientras que no se detecta

acetilación en el inmunoprecipitado de la IP con anti-p-Tyr empleando las células Rsrc (asterisco, Fig. 21A). Estos resultados indican que los fibroblastos embrionarios de ratón Rsrc presentan las dos modificaciones, sin embargo como se observa en la IP p-Tyr, la fracción de fosfo-cortactina no está acetilada simultáneamente (Fig. 21A).

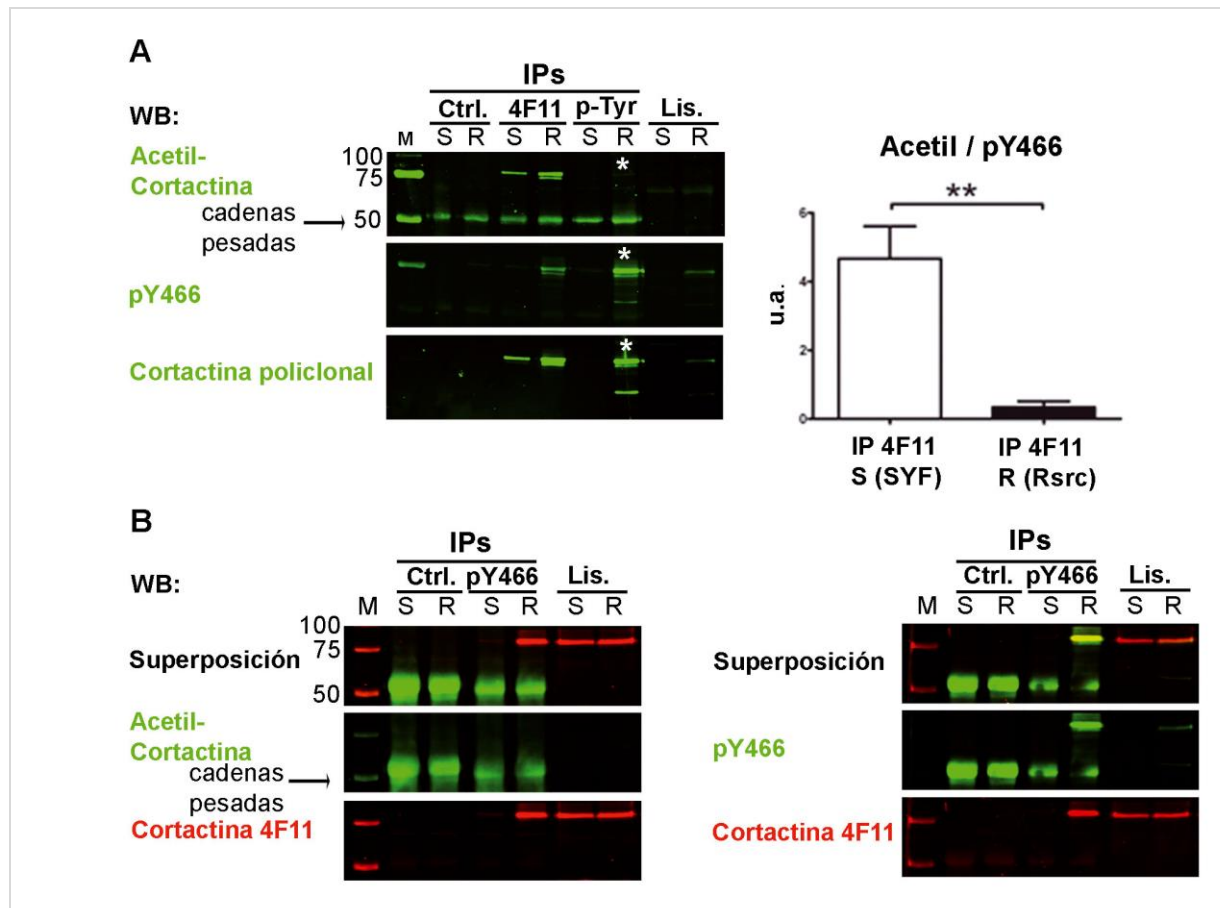


Figura 21. Análisis de la acetilación y la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina endógena en fibroblastos de ratón SYF y Rsrc. A) Se realizaron IPs en paralelo con los anticuerpos AcMo anti-IgG como control de isotipo (Ctrl.), anti-cortactina 4F11 (IP 4F11) y anti-fosfotirosina genérico (p-Tyr) usando los lisados de fibroblastos embrionarios de ratón SYF (S) y Rsrc (R). Las IPs fueron analizadas por WB con el anticuerpo anti-acetil-cortactina polyclonal (en verde). Tras un *stripping* para eliminar el anticuerpo, la membrana se reincubó con el anticuerpo anti-pY466 polyclonal, a continuación se llevó a cabo un *stripping* y se reincubó con el anticuerpo anti-cortactina polyclonal. Para realizar el análisis estadístico se calculó el ratio de las señales de acetilación/pY466 de cortactina en las IPs con el anticuerpo anti-cortactina 4F11. En la gráfica se representa la media \pm SEM y el análisis *t*-Student de 6 experimentos independientes. u.a.: unidades arbitrarias. **, $p < 0,01$. El asterisco destaca la IP con el anticuerpo anti-p-Tyr monoclonal de células Rsrc en la que se observa fosforilación pero no acetilación de cortactina. **B)** Se efectuaron IPs con el anticuerpo anti-pY466 polyclonal y con el anticuerpo anti-IgG de conejo (Ctrl.) como control de isotipo. Se realizó el análisis por WB con los anticuerpos anti-acetil-cortactina polyclonal y anti-cortactina 4F11. Tras un *stripping*, la membrana se reincubó con los anticuerpos anti-pY466 y anti-cortactina 4F11. Las flechas señalan las cadenas pesadas de los anticuerpos empleados en las IPs. Lis.: lisados. Los experimentos efectuados en el apartado A) fueron realizadas por Eugenia Meiler. Los experimentos efectuados en el apartado B) fueron realizadas por Elvira Nieto Pelegrín y Eugenia Meiler.

El análisis por WB de las IPs con el anticuerpo anti-cortactina 4F11 fue cuantificado en seis experimentos independientes. El análisis estadístico de la cuantificación muestra diferencias estadísticamente significativas en los ratios de las señales acetilación/fosforilación en residuos de tirosina comparando los tipos celulares SYF y Rsrc (Fig. 21A, gráfica). Por tanto, estos resultados indican que las células SYF presentan un ratio mayor de acetilación/fosforilación en residuos de tirosina de cortactina en comparación a las células Rsrc.

Para confirmar los resultados anteriores se llevaron a cabo IPs de cortactina fosforilada con el anticuerpo anti-pY466 empleando lisados de células SYF y Rsrc (Fig. 21B).

Posteriormente, se efectuó el análisis de las IPs por WB con los anticuerpos anti-acetil-cortactina y anti-cortactina 4F11 en incubaciones secuenciales. A continuación, se llevó a cabo un *stripping* y las membranas se reincubaron con los anticuerpos anti-pY466 y anti-cortactina 4F11.

El análisis de las IPs por WB con el anticuerpo anti-pY466 muestra que fosfo-cortactina es inmunoprecipitada únicamente en las células Rsrc (Fig. 21B). Esto se debe a que las células SYF presentan niveles de fosfo-cortactina indetectables al carecer de las principales quinasas de la familia Src, como se ha mencionado anteriormente (Fig. 21A). Además, no se observa acetilación en la IP con el anticuerpo anti-pY466 de las células Rsrc (Fig. 21B), al igual que en la IP con el anticuerpo anti-p-Tyr (Fig. 21A, asterisco).

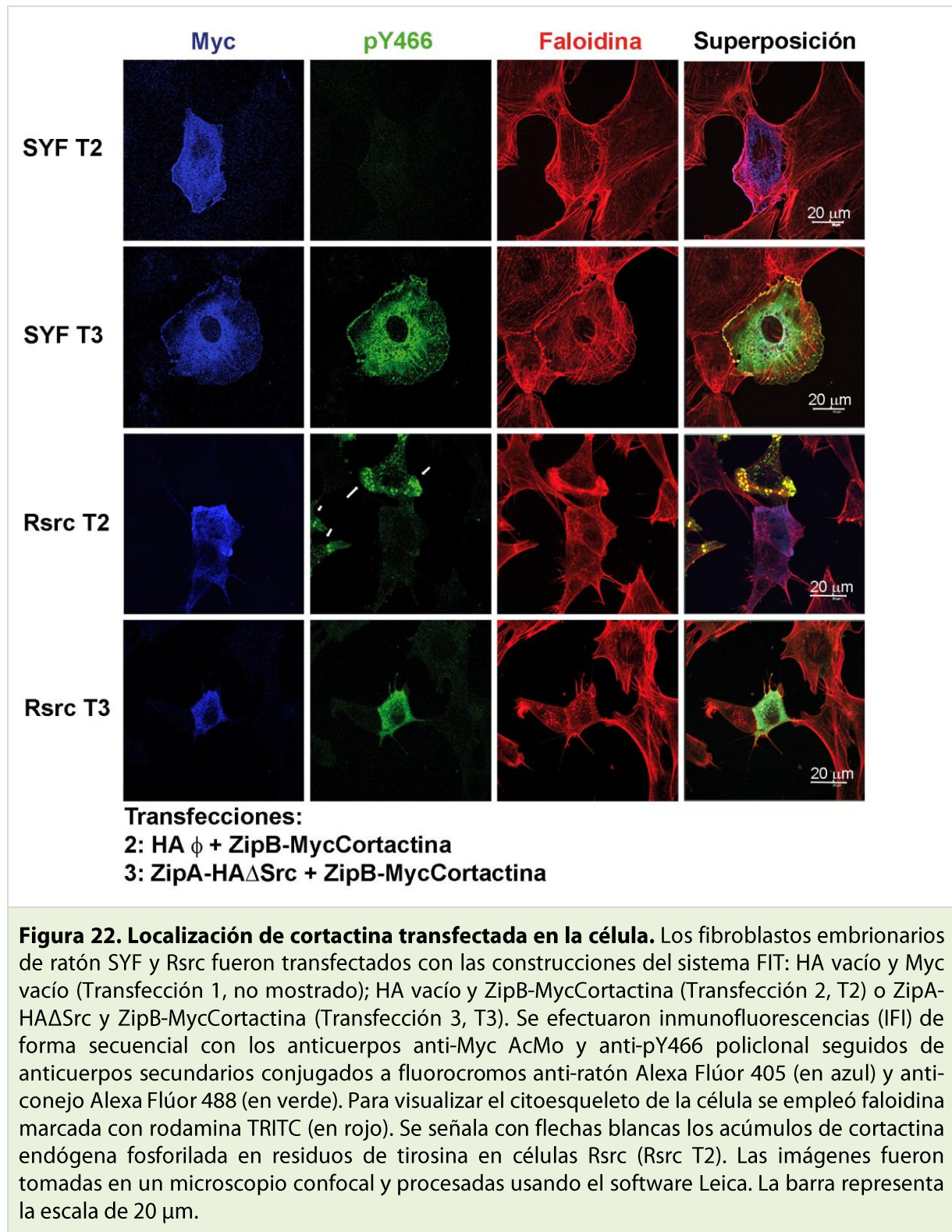
En conjunto, estos resultados indican que en la mayoría de moléculas de cortactina endógena la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación no ocurren de forma simultánea, lo cual parece indicar una relación de competición entre ambas modificaciones post-traduccionales. Estos datos concuerdan con los obtenidos mediante transfecciones.

6. Localización de cortactina fosforilada por la quinasa Src mediante el sistema FIT

Para visualizar la localización de fosfo-cortactina en células SYF y Rsrc se efectuaron transfecciones con las construcciones del sistema FIT: HA vacío y ZipB-MycCortactina (Fig. 22, Transfección 2), así como ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (Fig. 22, Transfección 3) en dichas líneas celulares. Además se transfectaron las células SYF y Rsrc con los vectores vacíos como control de la transfección (no mostrado).

Las células transfectadas fueron fijadas y empleadas para realizar inmunofluorescencias indirectas (IFIs) que se visualizaron con un microscopio confocal. Para detectar ZipB-MycCortactina se empleó el anticuerpo anti-Myc monoclonal de ratón

reconocido por un anticuerpo secundario Alexa-Flúor 405. Para detectar fosfo-cortactina se empleó el anticuerpo anti-pY466 policlonal reconocido por un anticuerpo secundario Alexa-Flúor 488. Finalmente, para la detección del citoesqueleto de actina se utilizó faloidina conjugada a isotiocianato de tetrametil-rodamin (TRITC) (Fig. 22).



Los niveles de cortactina endógena fosforilada en residuos de tirosina en las células SYF son prácticamente indetectables por IFI en nuestras condiciones experimentales, al igual que mediante análisis por WB de las IPs efectuadas con los anticuerpos anti-p-Tyr y anti-pY466 (Fig. 21). Además, las IFI revelan que las células que sobreexpresan únicamente cortactina no parecen presentar niveles incrementados de fosfo-cortactina con respecto al nivel basal (Fig. 22, co-transfección 2, T2).

La co-transfección de cortactina y la quinasa Src usando el sistema FIT aumenta los niveles de fosfo-cortactina en las células SYF y Rsrc (Fig. 22, T3). Dicho incremento se observa más fácilmente en las células SYF debido a que presentan un nivel basal de fosfo-cortactina prácticamente nulo. En las células SYF, cortactina transfectada se localiza en la zona cortical de la célula y alrededor del núcleo. Estos resultados coinciden con la localización de cortactina endógena previamente descrita (Weed and Parsons 2001).

Por el contrario, las células Rsrc presentan niveles basales detectables de fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src endógena como se observa en la transfección en la que se sobreexpresa únicamente cortactina (Fig. 22, Rsrc T2). Además, las células Rsrc presentan acúmulos de actina y cortactina endógena fosforilada en residuos de tirosina que se superponen en la IFI (Fig. 22, flechas blancas).

Como se puede observar en la Fig. 22, las células Rsrc transfectadas con cortactina y la proteína tirosina quinasa Src del sistema FIT presentan una morfología más retraída (Fig. 22, T3) que las células Rsrc que únicamente sobreexpresan cortactina (Fig. 22, T2).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de cortactina con el sistema FIT presenta una localización similar a cortactina endógena, además sugieren un posible papel de cortactina en la adhesión de la célula al sustrato, la cual se analizó a continuación.

7. Estudio del papel de cortactina durante el *spreading* celular

7.1 Análisis de la fosforilación de cortactina durante el *spreading* celular

Debido a que se observa una alteración de la adhesión en las células que sobreexpresan fosfo-cortactina (Fig. 22, T3) decidimos determinar el papel de cortactina en el *spreading* celular.

El *spreading* se puede analizar *in vitro* mediante el traspaso de células en suspensión a una superficie previamente tratada con proteínas de la matriz extracelular como fibronectina. Para analizar el papel de cortactina durante el *spreading* celular se realizaron transfecciones en las células SYF y Rsrc con los vectores del sistema FIT (Fig. 23 y Fig. 24).

Después de 20 h de transfección se efectuaron ensayos de *spreading* celular sobre fibronectina durante 1 hora y 3 horas, tras lo cual las células fueron fijadas.

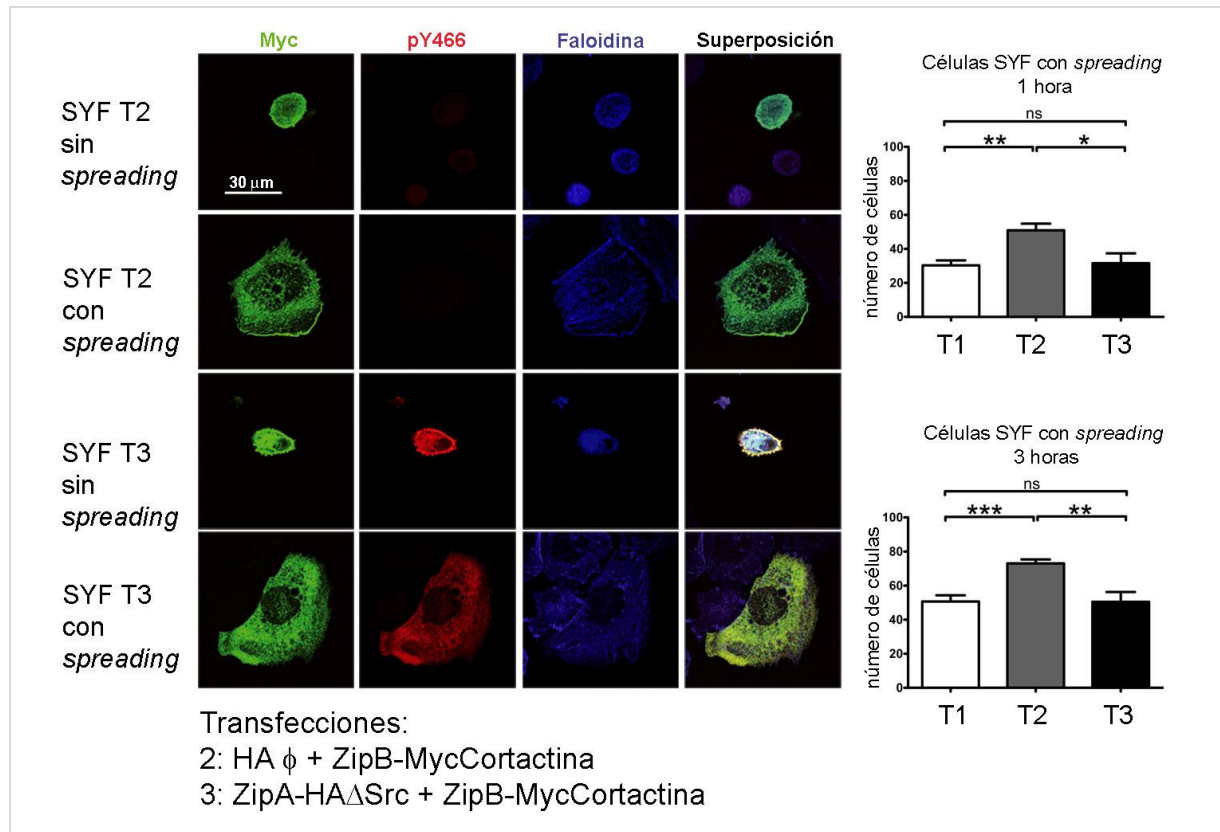
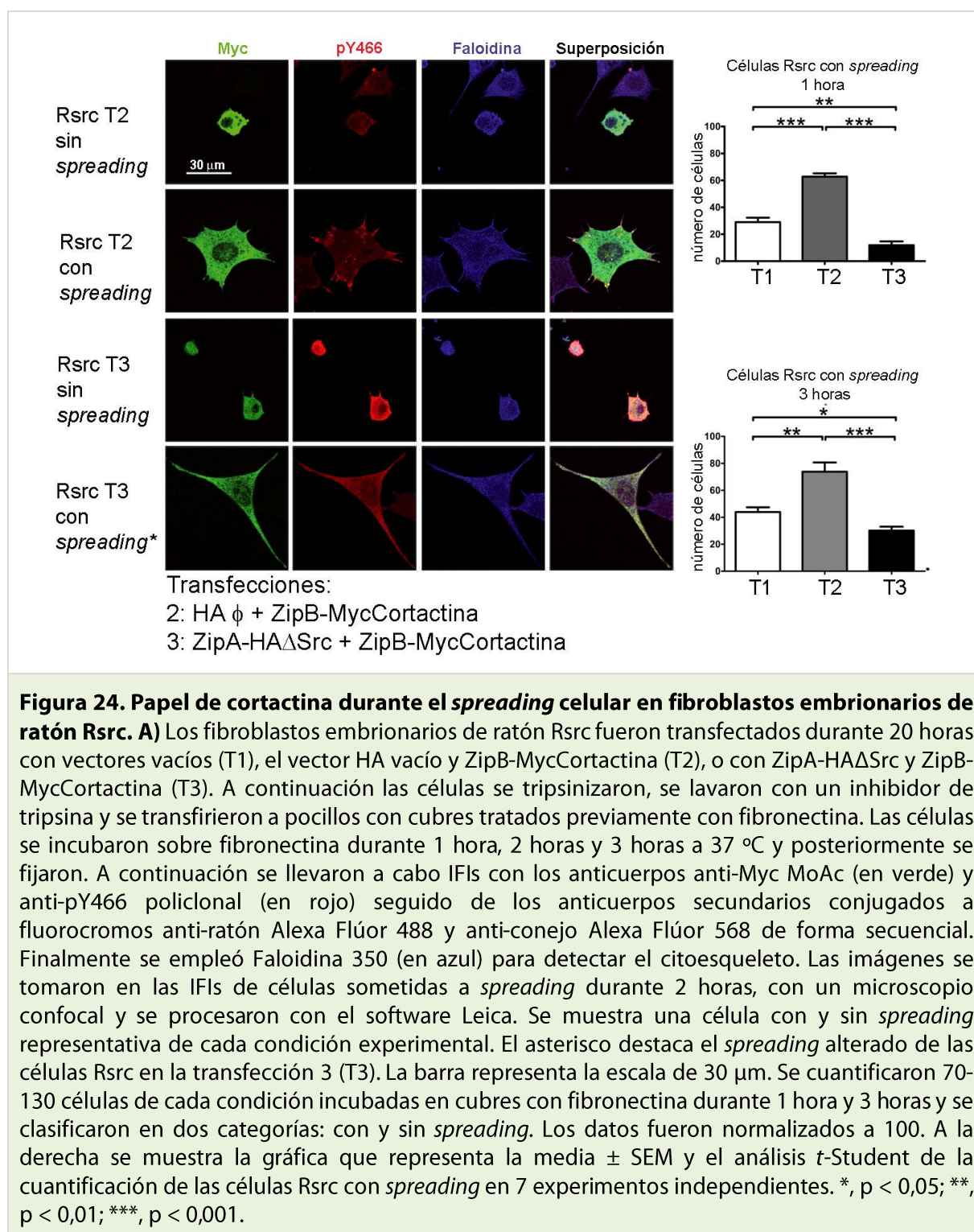


Figura 23. Papel de cortactina durante el *spreading* celular en fibroblastos embrionarios de ratón SYF. Los fibroblastos embrionarios de ratón SYF fueron transfectados durante 20 horas con vectores vacíos (T1), con el vector HA vacío y ZipB-MycCortactina (T2), o con ZipA-HA Δ Src y ZipB-MycCortactina (T3). A continuación las células se tripsinizaron, se lavaron con un inhibidor de tripsina y se transfirieron a pocillos con cubres previamente tratados con fibronectina. Las células se incubaron sobre fibronectina durante 1 hora, 2 horas y 3 horas a 37 °C y posteriormente se fijaron. A continuación se llevaron a cabo IFIs con los anticuerpos anti-Myc AcMo (en verde) y anti-pY466 policlonal (en rojo) seguidos de los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos anti-ratón Alexa Flúor 488 y anti-conejo Alexa Flúor 568 de forma secuencial. Para detectar el citoesqueleto se utilizó Faloidina 350 (en azul). Las imágenes fueron tomadas empleando IFIs de células sometidas a *spreading* durante 2 horas, con un microscopio confocal y se procesaron con el software Leica. Se muestra una célula con y sin *spreading* representativa de cada condición experimental. La barra representa la escala de 30 μ m. Se cuantificaron de 60-120 células transfectadas de cada condición incubadas en cubres con fibronectina durante 1 hora y 3 horas y se clasificaron en dos categorías: con y sin *spreading*. Los datos fueron normalizados a 100. A la derecha se muestra la gráfica que representa la media \pm SEM y el análisis *t*-Student de la cuantificación de las células SYF con *spreading* en 6 experimentos independientes. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Posteriormente, las células fijadas se emplearon para efectuar IFIs. Para detectar cortactina transfectada (ZipB-MycCortactina) o Myc vacío se empleó el anticuerpo anti-Myc monoclonal que fue reconocido por un anticuerpo secundario Alexa Flúor 488. Asimismo, para detectar fosfo-cortactina se empleó el anticuerpo anti-pY466 seguido de un

anticuerpo secundario Alexa Flúor 568. El citoesqueleto fue marcado con faloidina 350 (Fig. 23 y Fig. 24). Se contaron células transfectadas en las líneas celulares SYF y Rsrc con las condiciones: vectores vacíos (T1), cortactina (T2) y fosfo-cortactina (T3). Las células transfectadas se clasificaron como células con *spreading* (expandidas) y sin *spreading* (no expandidas) en dos intervalos de tiempo: 1 hora y 3 horas. Los resultados fueron normalizados a 100 células.



En la Fig. 23, se muestra una imagen representativa de lo que se ha considerado como células SYF con *spreading* y sin *spreading* en cada condición. En la co-transfección 3 solamente se contaron aquellas células transfectadas que presentaban una señal intensa de fosforilación en residuos de tirosina.

Se cuantificaron seis experimentos independientes de *spreading* sobre fibronectina durante 1 hora y 3 horas en células SYF (Fig. 23, gráfica). El análisis estadístico de la cuantificación muestra un incremento significativo del *spreading* a 1 hora en las células SYF que sobreexpresan cortactina (Fig. 23, T2), comparado con las células SYF transfectadas con los vectores vacíos (Fig. 23, T1) y con las células SYF que sobreexpresan fosfo-cortactina (Fig. 23, T3). Este patrón también se observa tras 3 horas de *spreading* sobre fibronectina empleando células SYF.

En la Fig. 24, se muestra una imagen representativa de lo que se ha considerado como células Rsrc con *spreading* y sin *spreading* en cada condición: vector HA vacío y ZipB-MycCortactina (T2), o ZipA-HAΔSrc y ZipB-MycCortactina (T3). En la co-transfección 3 únicamente se contaron aquellas células transfectadas que presentaban una señal intensa de fosforilación en residuos de tirosina.

Se cuantificaron siete experimentos independientes de *spreading* sobre fibronectina durante 1 hora y 3 horas empleando células Rsrc (Fig. 24, gráfica). El análisis estadístico de la cuantificación muestra un incremento significativo del *spreading* a 1 hora en las células Rsrc que sobreexpresan cortactina (Fig. 24, T2), comparado con las células Rsrc transfectadas con los vectores vacíos (Fig. 24, T1) y con las células Rsrc que sobreexpresan fosfo-cortactina (Fig. 24, T3). Por el contrario, la sobreexpresión de fosfo-cortactina provoca una inhibición significativa del *spreading* celular comparado con las otras dos condiciones. Este patrón también se observa a las 3 horas de incubación sobre fibronectina empleando células Rsrc.

Estos datos sugieren que la sobreexpresión de cortactina favorece el *spreading* celular, mientras que la sobreexpresión de fosfo-cortactina tiene un efecto inhibitorio sobre dicho proceso.

7.2 Análisis de la acetilación de cortactina durante el *spreading* celular

Para analizar si la relación de competición entre la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina observada en los experimentos previos ocurre durante el *spreading* celular, se efectuaron ensayos de *spreading* sobre fibronectina usando las células Rsrc en presencia y ausencia del inhibidor PP2 (4-Amino-3-(4-clorofenil)-1-(t-

butil)-1H-pirazol [3,4-d]pirimidina). El compuesto PP2 es un inhibidor selectivo de la familia de proteínas tirosina quinasas Src (Fig. 25) (Hanke, Gardner *et al.* 1996).

Los fibroblastos embrionarios de ratón Rsrc fueron incubados en tres placas con fibronectina durante 1 hora y 3 horas. A una de las placas con células Rsrc incubadas sobre fibronectina durante 3 horas se le añadió PP2 durante 2 horas. Se llevaron a cabo IPs de cortactina con el anticuerpo anti-cortactina 4F11 usando los lisados de las células Rsrc sometidos a *spreading* con o sin el tratamiento con el compuesto PP2. Como control de isotipo de las IPs se empleó el anticuerpo anti-IgG.

Como se muestra en la Fig. 25, se efectuó el análisis por WB con los anticuerpos anti-acetil-cortactina y anti-cortactina 4F11 de forma secuencial. A continuación, se llevó a cabo un *stripping* de la membrana y se reincubó con el anticuerpo anti-pY466.

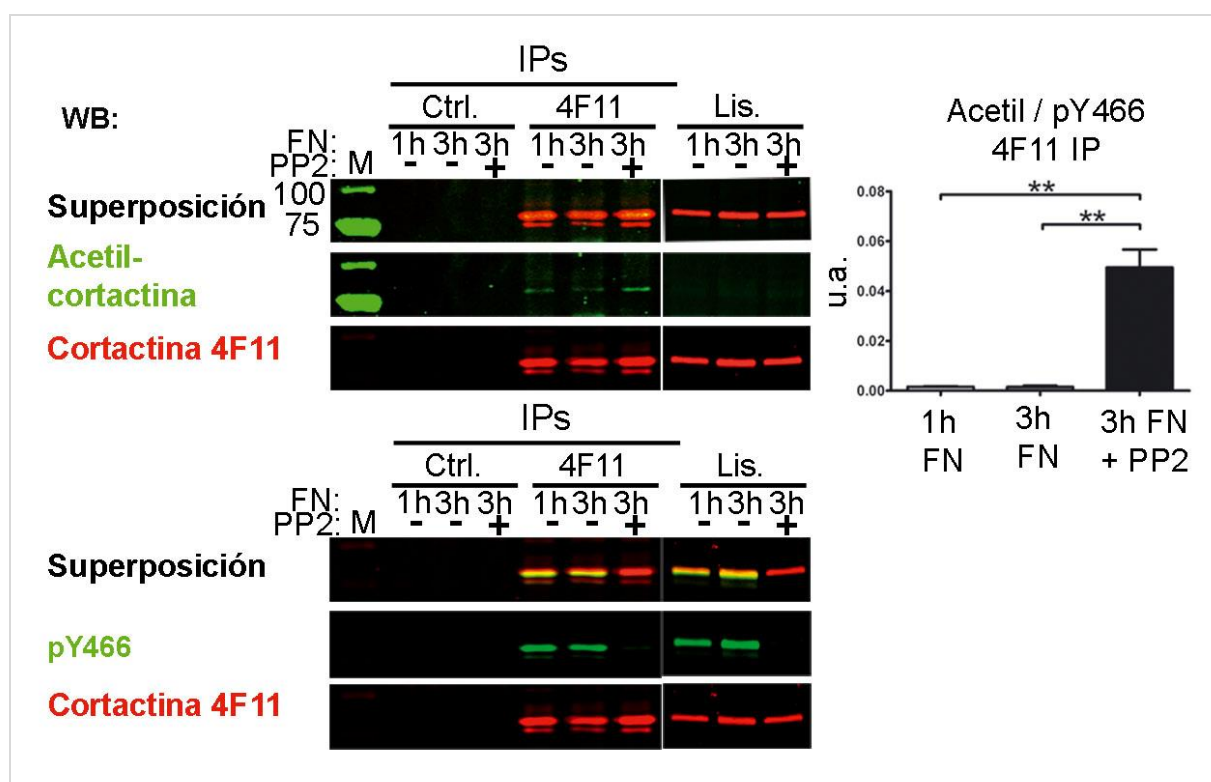


Figura 25. Análisis del estatus de la acetilación y fosforilación en residuos de tirosina de cortactina durante el *spreading* celular. Se llevaron a cabo ensayos de *spreading* celular con células Rsrc durante 1 hora y 3 horas. En paralelo se incubaron células con fibronectina (FN) durante 1 hora y se añadió PP2, inhibidor selectivo de la familia de proteínas tirosina quinasas Src, a una concentración de 10 μ M durante 2 horas. Los lisados se usaron para efectuar IPs con los anticuerpos anti-cortactina 4F11 MoAc o anti-IgG como control de isotipo (Ctrl.). Se efectuó el análisis por WB con los anticuerpos anti-acetil-cortactina policlonal y anti-cortactina 4F11 de forma secuencial. Se eliminaron los anticuerpos de la membrana por *stripping* y se reincubó con los anticuerpos anti-pY466 policlonal (pY466) y anti-cortactina 4F11. La gráfica representa la media \pm SEM y el análisis *t*-Student de la cuantificación en 3 experimentos independientes del ratio de las señales de acetilación/pY466 de cortactina. u.a.: unidades arbitrarias. **, $p < 0,01$. Lis.: lisados.

Como se observa en el análisis por WB de las IPs, el inhibidor PP2 disminuye drásticamente la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina (Fig. 25), como era esperable.

El análisis estadístico de la cuantificación de tres experimentos independientes muestra que el tratamiento con PP2 incrementa significativamente el ratio acetilación/fosforilación de cortactina. Estos resultados sugieren que la inhibición de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina durante el *spreading* celular podría favorecer la acetilación de cortactina, lo cual apoya los experimentos previos (Fig. 18-21). Por otra parte, no se detectan diferencias en el ratio de acetilación/pY466 de cortactina en los lisados de células Rsrc sometidas a *spreading* sobre fibronectina durante 1 hora y 3 horas.

7.3 Implicación de cortactina en las adhesiones focales

Para caracterizar cómo se altera el *spreading* celular por la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina se analizó la formación de las adhesiones focales. La proteína vinculina se concentra en las adhesiones focales durante el *spreading* celular con fibronectina (Geiger 1979). Por ello se efectuaron IFIs empleando un anticuerpo que reconoce la proteína vinculina.

Para analizar el efecto de cortactina en la formación de adhesiones focales se efectuaron co-transfecciones con los vectores del sistema FIT en células SYF y Rsrc (Fig. 26). Se co-transfectaron los vectores vacíos (Fig. 26, T1) y por otro lado se sobreexpresó cortactina (Fig. 26, T2) o fosfo-cortactina (Fig. 26, T3). Después de 20 h de transfección se llevaron a cabo ensayos de *spreading* celular sobre fibronectina durante 3 horas y se fijaron las células.

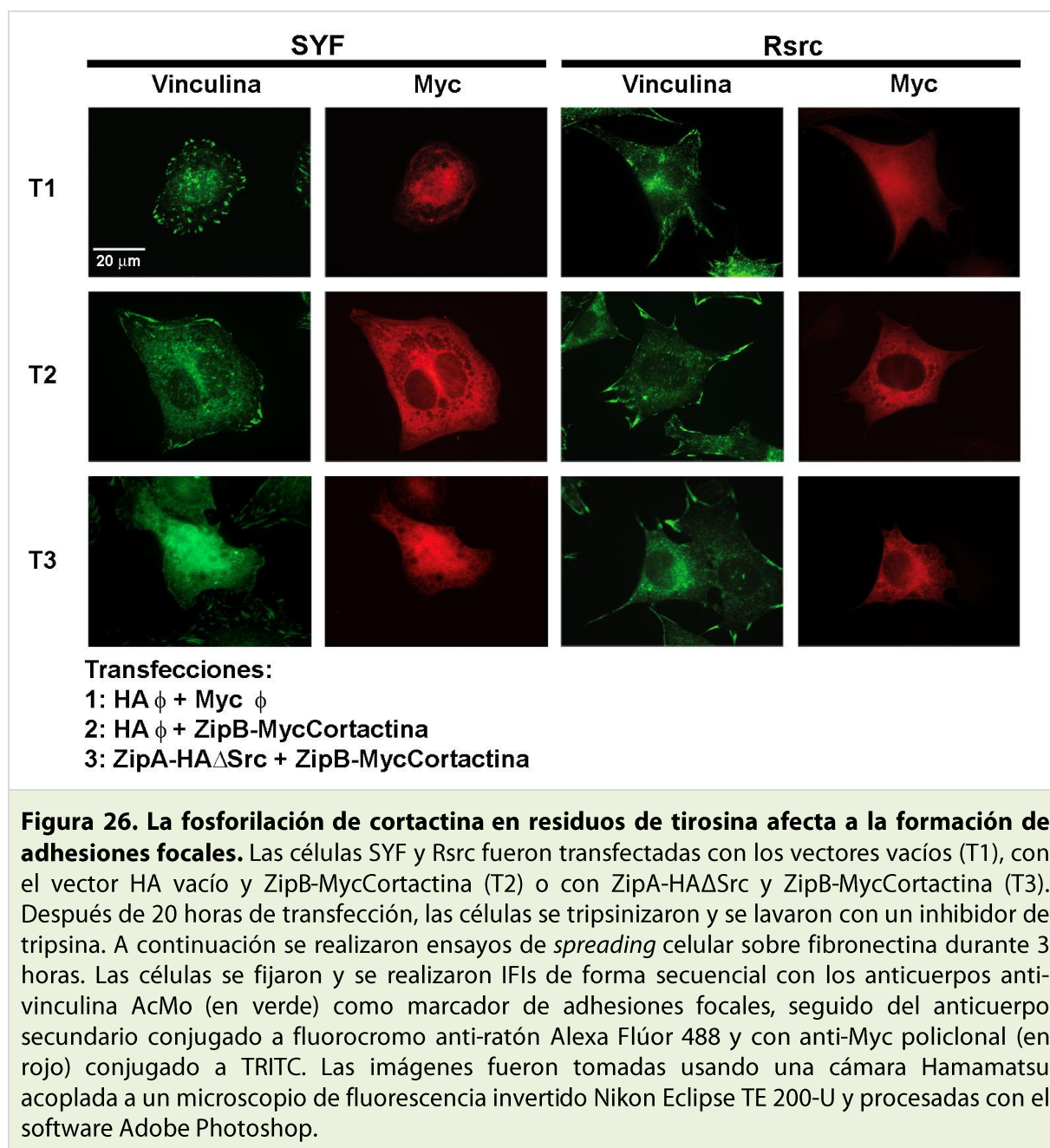
A continuación, se efectuaron IFIs de las células fijadas. Para detectar las adhesiones focales se empleó el anticuerpo anti-vinculina monoclonal de ratón reconocido por un anticuerpo secundario Alexa Flúor 488. Además, para detectar cortactina transfectada se empleó el anticuerpo anti-Myc policlonal conjugado a TRITC (Fig. 26).

En las IFIs se observa que las células que sobreexpresan únicamente cortactina (Fig. 26, T2) presentan un mayor número de adhesiones focales que las células transfectadas con los vectores vacíos como control (Fig. 26, T1).

Por otro lado se observa que las células que sobreexpresan fosfo-cortactina (Fig. 26, T3) presentan un menor número de adhesiones focales que aquellas que sobreexpresan únicamente cortactina (Fig. 26, T2), lo que es más evidente en las células Rsrc que en las

SYF (Fig. 26). Además se observa que la proteína vinculina no se concentra en las adhesiones focales en las células que sobreexpresan fosfo-cortactina (Fig. 26, T3). Estos resultados sugieren que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina afecta a la localización de la proteína vinculina en las adhesiones focales.

Además, muchas de las células que sobreexpresan fosfo-cortactina presentan una morfología alargada (Fig. 26, T3), al igual que en los resultados previos presentados (Fig. 24). Estos resultados sugieren que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina tiene un efecto inhibitorio sobre la formación de adhesiones focales, en concordancia con los resultados de las Figs. 23 y 24.



8. Análisis de la interacción de cortactina y la quinasa FAK durante el *spreading* celular

8.1 Papel de la fosforilación de cortactina en la interacción con la quinasa FAK

La proteína tirosina quinasa FAK está implicada en la regulación de la dinámica de adhesiones focales (revisado en (Schaller 2010)). En colaboración, la investigadora principal había descrito la interacción entre cortactina y la quinasa FAK tras la infección por *Helicobacter pylori* (Tegtmeyer, Wittelsberger *et al.* 2011). Por tanto, para entender el mecanismo por el cual fosfo-cortactina afecta a la formación de las adhesiones focales, se analizó la interacción de cortactina fosforilada por la quinasa Src mediante el sistema FIT con la proteína tirosina quinasa FAK durante el *spreading* celular.

Para ello se efectuaron ensayos de *spreading* empleando células HeLa incubadas sobre fibronectina durante 3 horas. En paralelo se dejaron células HeLa en suspensión como control (Fig. 27B).

El dominio SH3 de cortactina es necesario para su interacción con la quinasa FAK (Tegtmeyer, Wittelsberger *et al.* 2011). Por tanto, se expresó y purificó el dominio SH3 de cortactina recombinante fusionada a GST (GST-SH3) y GST vacío, como se había descrito previamente (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004). A continuación, para comprobar que ambas proteínas se expresaron eficientemente y fueron correctamente purificados se efectuó una electroforesis de las proteínas purificadas que se visualizaron por tinción con azul de Coomassie (Fig. 27A).

Posteriormente se efectuaron ensayos *Pull Down* (PD) con las proteínas purificadas (GST-SH3 y GST vacío) empleando los lisados de células HeLa en suspensión o sometidos a ensayos de *spreading* sobre fibronectina (Fig. 27B). GST vacío se empleó como control negativo de la interacción.

A continuación, se realizó el análisis de los PD por WBs con un anticuerpo policlonal que reconoce la proteína tirosina quinasa FAK. Como se observa en la Fig. 27B, el *spreading* sobre fibronectina favorece la interacción entre el dominio SH3 de cortactina y la quinasa FAK. Por tanto, el dominio SH3 de cortactina es suficiente para la interacción con la proteína tirosina quinasa FAK durante el *spreading* celular sobre fibronectina (Fig. 27B).

Para determinar el papel de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina en la formación del complejo cortactina-FAK (Fig. 27C), las células HeLa fueron transfectadas con las combinaciones más importantes de vectores del sistema FIT. Se sobreexpresó ZipB-MycCortactina (T1) o ZipB-MycCortactina y la proteína tirosina quinasa Src del sistema FIT

(T2). Después de 20 horas de transfección, se realizaron ensayos de *spreading* celular durante 3 horas sobre fibronectina.

Posteriormente, se efectuaron IPs con un anticuerpo monoclonal anti-FAK usando los lisados de células HeLa transfectadas sometidas a *spreading*. A continuación, se efectuó el análisis por WB de los inmunoprecipitados haciendo incubaciones secuenciales. Inicialmente la membrana se incubó con el anticuerpo anti-Myc, posteriormente con el anticuerpo policlonal anti-FAK y finalmente, con el anticuerpo anti-pY466.

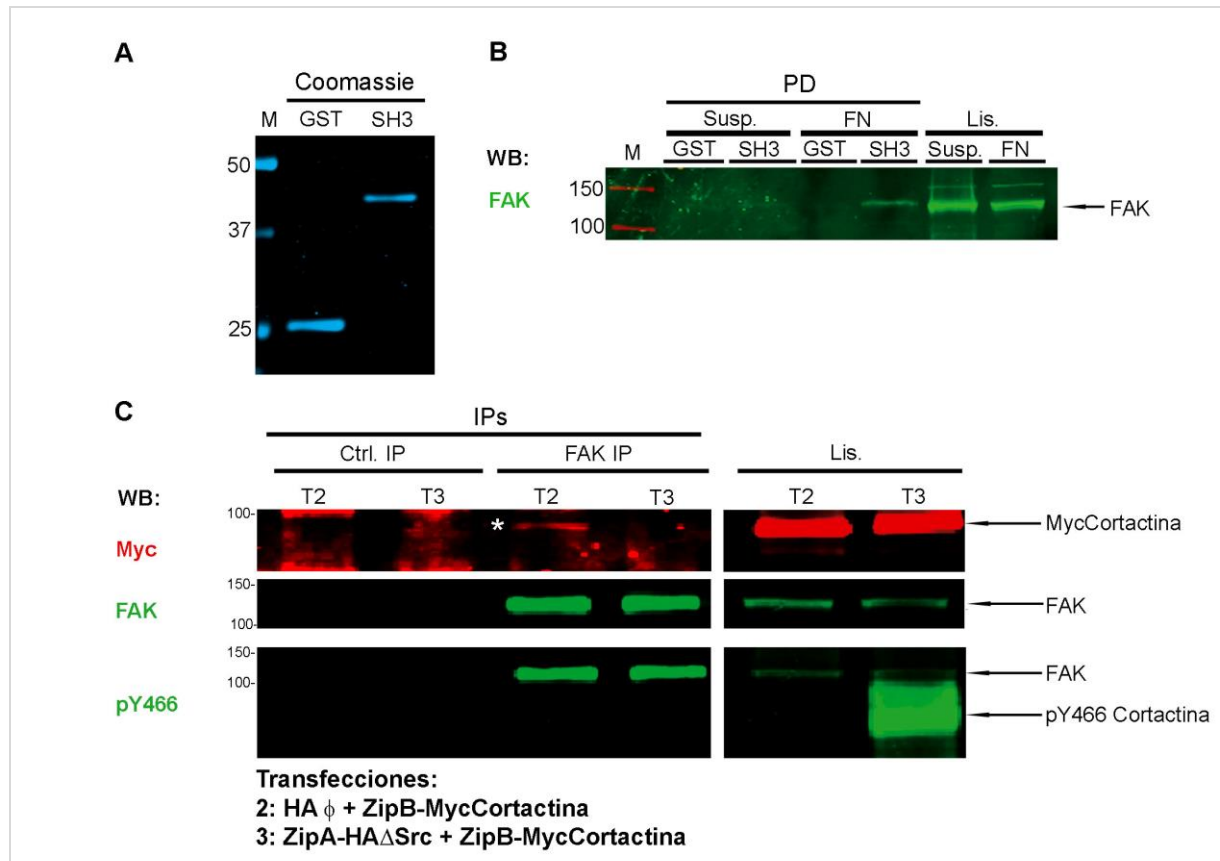


Figura 27. Interacción entre cortactina y la quinasa FAK durante el *spreading* celular. **A)** Electroforesis en SDS-PAGE y posterior tinción con azul de *Coomassie* de las proteínas purificadas: GST y GST-SH3 cortactina (SH3). El gel fue escaneado con el sistema *Odyssey*. **B)** Las células HeLa se tripsinizaron, se lavaron con un inhibidor de tripsina y se dejaron en suspensión (Susp.) o se incubaron durante 3 horas en placas previamente tratadas con fibronectina (FN). Se efectuaron ensayos *pull-down* (PD) con GST o GST-SH3 (SH3) usando los lisados celulares en suspensión o tras el *spreading* en FN. Los PDs se analizaron por WB con un anticuerpo policlonal que reconoce a la quinasa FAK. **C)** Las células HeLa se transfectaron con los vectores del FIT: HA vacío y ZipB-MycCortactina (T1) o ZipA-HA Δ Src y ZipB-MycCortactina (T2). Después de 20 horas de transfección se tripsinizaron, se lavaron con el inhibidor de tripsina y se incubaron durante 3 horas en placas previamente tratadas con FN. Los lisados fueron sometidos a IP con el anticuerpo anti-FAK AcMo. Se realizó el análisis por WB con los anticuerpos anti-Myc AcMo para detectar cortactina transfectada, anti-FAK policlonal, y anti-pY466 policlonal, de forma secuencial. El asterisco destaca la co-inmunoprecipitación de cortactina transfectada no fosforilada en la IP de FAK. Lis.: Lisados.

El análisis por WB de las IPs muestra que cortactina (T1) co-inmunoprecipita con la quinasa FAK (Fig. 27C, asterisco). Sin embargo, esta interacción no se observa cuando cortactina está mayoritariamente fosforilada en residuos de tirosina (T2). Estos resultados indican que cortactina interacciona con la quinasa FAK durante el *spreading* celular y que esta asociación es menos eficiente cuando cortactina está fosforilada en residuos de tirosina por la quinasa Src.

8.2 Implicación de la proteína N-WASP en el complejo cortactina-FAK

Se ha descrito que cortactina interacciona con la proteína N-WASP y que dicha interacción está desfavorecida por la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004). Asimismo, se ha descrito que la proteína tirosina quinasa FAK es capaz de interactuar con N-WASP (Wu, Suetsugu *et al.* 2004). Por tanto, decidimos analizar si la interacción entre cortactina y la quinasa FAK estaba mediada por la proteína N-WASP. Para ello se llevaron a cabo ensayos de *spreading* durante 1 hora sobre fibronectina en fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de N-WASP. Posteriormente se efectuaron ensayos PD como se ha descrito anteriormente, los cuales fueron analizados mediante WB con el anticuerpo monoclonal anti-FAK (Fig. 28).

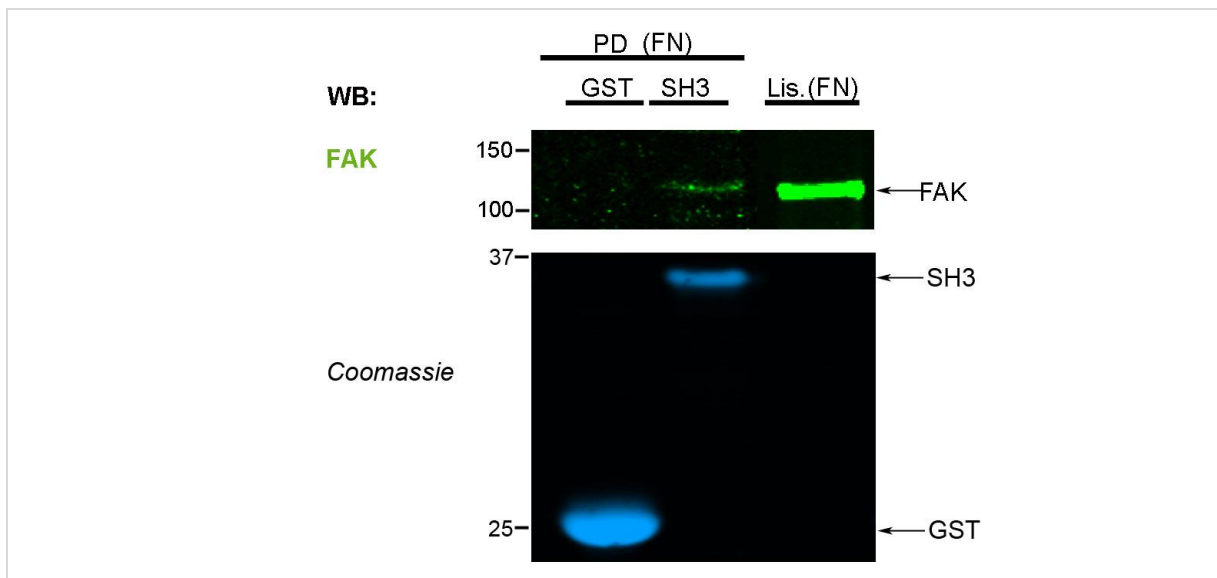


Figura 28. Análisis de la interacción cortactina-FAK durante el *spreading* en células deficientes en N-WASP. A) Electroforesis en SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie de las proteínas purificadas: GST y GST-SH3 cortactina. El gel fue escaneado con el sistema Odyssey. **B)** Los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de N-WASP se tripsinizaron, se lavaron con un inhibidor de tripsina y se incubaron sobre fibronectina (FN) durante 1 hora. Los lisados celulares fueron usados en ensayos PD con GST o GST-SH3 cortactina (SH3). A continuación se llevó a cabo el análisis de los PDs por WB con el anticuerpo anti-FAK AcMo. Lis.: Lisados.

Como se muestra en la Fig. 28, el dominio SH3 de cortactina es capaz de interactuar con la quinasa FAK en ausencia de N-WASP durante el *spreading* celular. Estos resultados indican que la proteína N-WASP no es necesaria para la interacción entre cortactina y la quinasa FAK durante el proceso de *spreading* celular.

9. Análisis de las adhesiones focales

Debido a la aparente implicación de cortactina en la dinámica de las adhesiones focales, la doctoranda de la presente tesis doctoral realizó una estancia en el Laboratorio del Dr. Christoph Ballestrem (University of Manchester, Reino Unido), en la cual profundizó en el estudio de estas estructuras.

El objetivo del estudio fue analizar la implicación de los diferentes dominios de unión a vinculina del bastón de talina en la estabilidad de las adhesiones focales. Para ello se co-transfectaron fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3 con diferentes construcciones que codifican para la proteína talina delecionada en distintas regiones del bastón fusionada a GFP y con una construcción que codifica para los primeros 880 aminoácidos de vinculina (vinculina880) fusionada a mCherry (mCherry-vin880). Tras 4 horas de transfección las células fueron sometidas a ensayos de *spreading* sobre fibronectina durante 16 horas (Fig. 29).

Posteriormente las células fijadas fueron observadas con un microscopio de fluorescencia Delta Vision RT y se tomaron imágenes de células que expresaban GFP-talina y mCherry-vin880. Las imágenes obtenidas de GFP-talina fueron analizadas con el programa ImageJ, el cual permite obtener datos cuantitativos sobre el tamaño y número de las adhesiones focales.

Como se ha comentado en la introducción, talina FL se encuentra en conformación inactiva acumulándose en el citoplasma. La interacción de talina con vinculina delecionada en la cola C-terminal promueve la activación de las integrinas y la maduración de las adhesiones focales ((Humphries, Wang *et al.* 2007). En la Fig. 29B se muestra un ejemplo del análisis de las adhesiones focales en células que sobreexpresan talina FL y vinculina880.

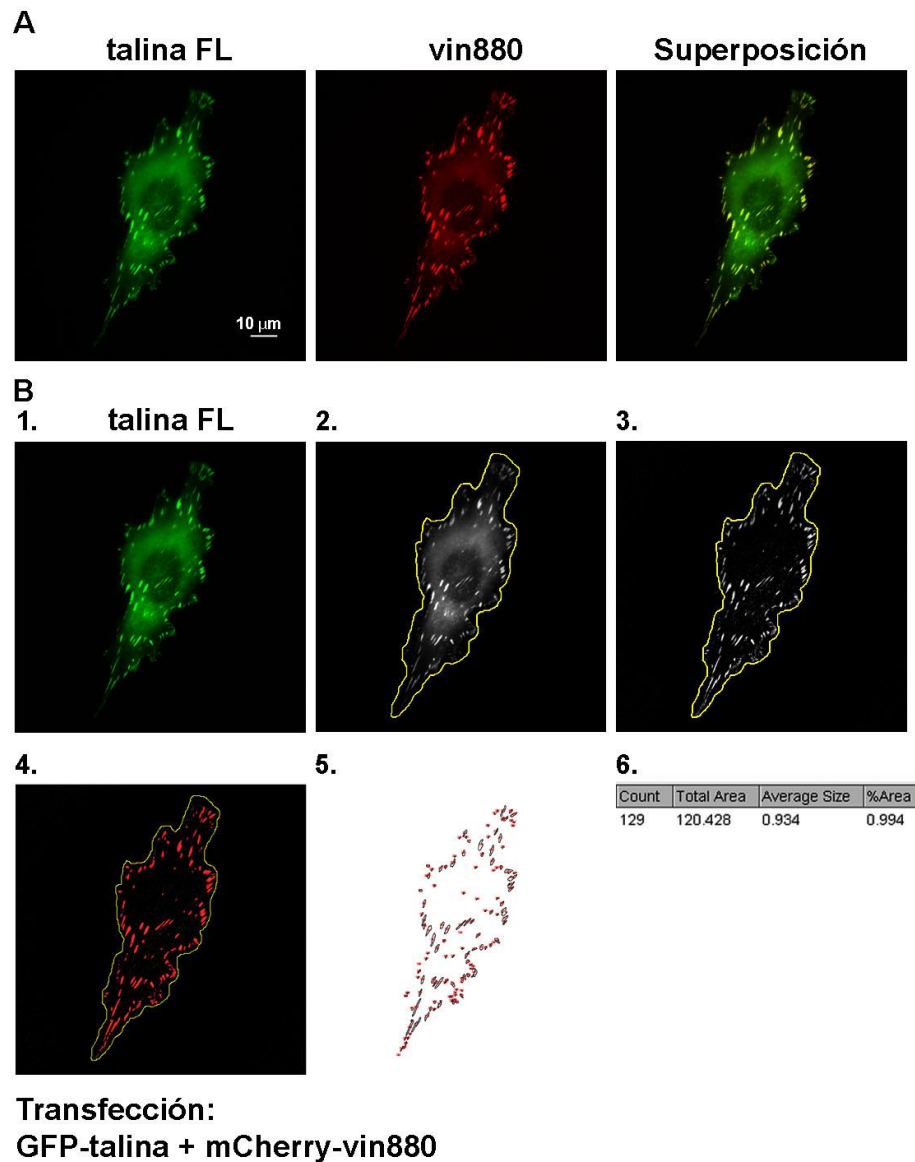


Figura 29. Análisis de las adhesiones focales formadas en fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3 transfectados con GFP-talina y mCherry-vin880. **A)** Las células NIH 3T3 fueron transfectadas con GFP-talina y mCherry-vin880. Después de 4 horas de transfección, las células se tripsinizaron. A continuación se realizaron ensayos de *spreading* celular sobre fibronectina *overnight*. Las células se fijaron y se visualizaron con un microscopio Delta Vision RT (Applied Precision) equipado con un objetivo de aceite de inmersión 60×/1.42 Plan Apo (Zeiss) y con una cámara CoolSnap HQ (Photometrics). La barra representa la escala de 10 μm . **B)** Las imágenes de GFP-talina fueron analizadas con el programa ImageJ siguiendo los pasos que se describen a continuación: 1. Talina; 2. Dibujo a mano alzada de la superficie celular; 3. Eliminación de las partículas inferiores a 10 píxeles; 4. Selección de los elementos considerados adhesiones focales; 5. Contaje de las adhesiones focales; 6. Tabla resumen con los datos obtenidos del análisis de la imagen.

Parte II: Estudio del papel inhibitorio y redundante de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación de pedestales por EPEC

1. Localización de CrkII y del mutante CrkII R38V

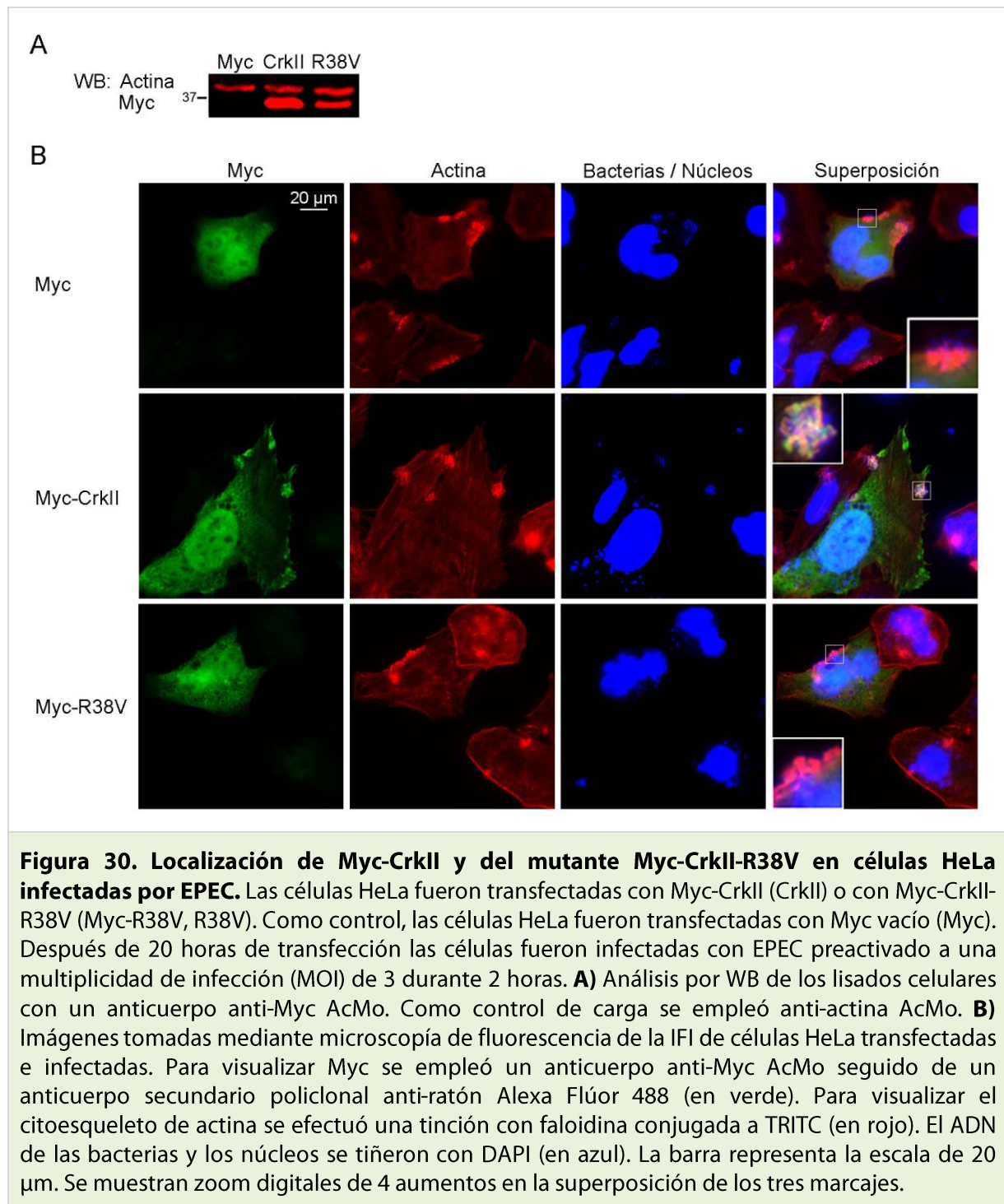
Un estudio inicial indicó que la proteína adaptadora CrkII se localiza en los pedestales de actina formados en células HeLa tras la infección por EPEC (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Sin embargo, la función de la familia de proteínas adaptadoras Crk en la formación del pedestal no había sido dilucidada. Por ello nuestro grupo decidió investigar el papel de estas proteínas adaptadoras en la formación del pedestal. Los resultados previos de nuestro grupo, presentados en la tesis doctoral de Elvira Nieto Pelegrín, indican que la familia de proteínas adaptadoras Crk presenta un papel inhibitorio y redundante en la formación de los pedestales de actina originados tras la infección por EPEC (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral).

Para explicar el mecanismo por el cual las proteínas adaptadoras Crk inhiben la formación de pedestales se desarrollaron diversas estrategias, una de ellas fue el estudio de la localización de estas proteínas en células infectadas por EPEC.

La proteína adaptadora CrkII endógena se localiza en los pedestales tras la infección por EPEC, como se ha mencionado anteriormente (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Para analizar la contribución de los distintos dominios de la proteína CrkII en su localización en el pedestal se llevaron a cabo transfecciones con Myc-CrkII en células HeLa como control. Asimismo se efectuaron transfecciones con un mutante de CrkII, denominado Myc-CrkII-R38V (Myc-R38V) (Fig. 30).

El mutante Myc-CrkII-R38V contiene una sustitución de arginina a valina en la posición 38, la cual está situada en el dominio SH2. Está descrito que esta mutación impide la unión de proteínas a través del dominio SH2 de CrkII (Matsuda, Hashimoto *et al.* 1994; Kiyokawa, Hashimoto *et al.* 1998).

Como control de la localización de Myc-CrkII y Myc-CrkII-R38V, las células HeLa fueron transfectadas con Myc vacío. Posteriormente las células fueron infectadas durante 2 horas con EPEC preactivado, a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. A continuación se efectuó un análisis por WB de la expresión de Myc-CrkII y de Myc-CrkII-R38V en los lisados celulares, para lo cual se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Myc (Fig. 30A). Como se puede observar en la Fig. 30A, tanto Myc-CrkII como Myc-CrkII-R38V se expresan eficientemente en las células HeLa transfectadas.



En paralelo, para analizar la localización de Myc-CrkII y de Myc-CrkII-R38V se efectuaron IFIs con el anticuerpo anti-Myc en las células fijadas (Fig. 30B). El citoesqueleto de actina se visualizó con la tinción de faloidina-TRITC. El ADN de las bacterias y de los núcleos celulares fue marcado con DAPI.

En las imágenes tomadas de la IFI (Fig. 30B) se observa que Myc-CrkII se acumula en la zona de los pedestales, en concordancia con la localización de CrkII endógeno (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Por el contrario, el mutante Myc-CrkII-R38V y Myc vacío no se

concentran en los pedestales. Estos resultados sugieren que la localización de CrkII en el pedestal podría estar mediada por su dominio SH2.

2. Localización y análisis del efecto del dominio SH2 aislado de CrkII

Para confirmar que la localización de CrkII está mediada por su dominio SH2 y determinar el efecto de este dominio en los pedestales de actina formados por EPEC, se sobreexpresó el dominio SH2 aislado de CrkII (Fig. 31). Para ello se efectuaron transfecciones en células HeLa con un vector que codifica para el dominio SH2 aislado de CrkII fusionado a la etiqueta GFP (SH2-GFP). Como control del efecto del dominio SH2 de CrkII en la formación de pedestales, las células HeLa fueron transfectadas con un vector que codifica para GFP (GFP vacío). A continuación, las células fueron infectadas durante 2 horas con EPEC preactivado, a una MOI de 3.

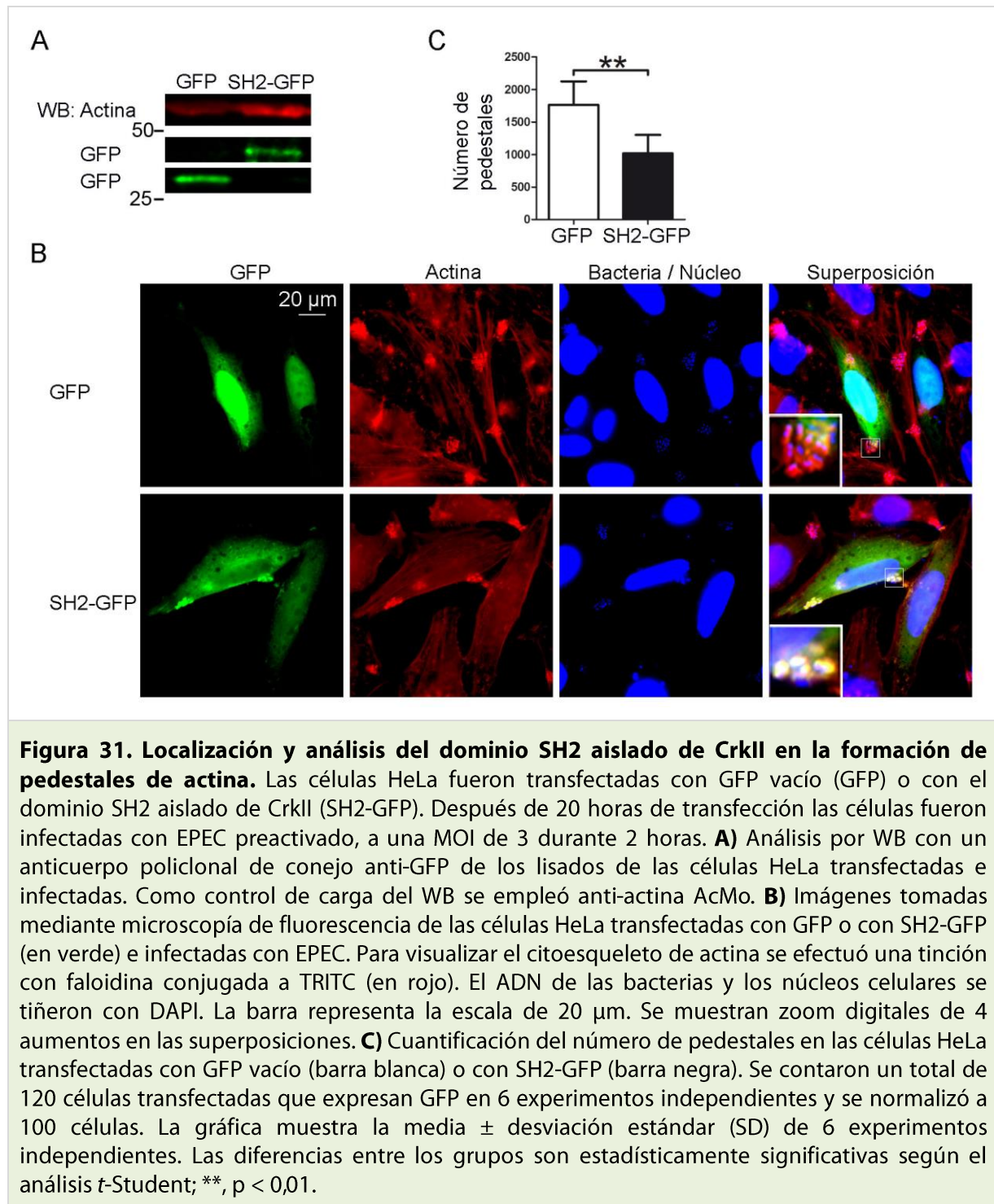
Los lisados celulares fueron analizados por WB con un anticuerpo policlonal anti-GFP (Fig. 31A). Como control de carga se utilizó un anticuerpo que reconoce actina. Como se puede observar en la Fig. 31A, el dominio SH2-GFP y GFP vacío se expresan eficientemente en las células HeLa transfectadas.

Para visualizar el citoesqueleto de actina se llevó a cabo la tinción con faloidina-TRITC. El ADN de la bacteria y de los núcleos celulares fue marcado con DAPI. En las tinciones efectuadas se observa un acúmulo de SH2-GFP en los pedestales, mientras que GFP vacío no se concentra en estas estructuras (Fig. 31B). Este resultado cualitativo sugiere que el dominio SH2 de CrkII podría ser suficiente para la localización de CrkII en el pedestal.

Las tinciones visualizadas por microscopía de fluorescencia fueron utilizadas para cuantificar el número de pedestales de actina formados tras la infección por EPEC en las células HeLa transfectadas con SH2-GFP o con GFP vacío. El análisis estadístico de la cuantificación en seis experimentos independientes muestra una disminución significativa en el número de pedestales en las células que sobreexpresan SH2-GFP en comparación con las células que sobreexpresan GFP vacío (Fig. 31C). Estos resultados indican que la sobreexpresión del dominio SH2 aislado de CrkII inhibe la formación de pedestales de actina por EPEC.

Para analizar si la inhibición de la formación de pedestales por el dominio SH2 aislado de CrkII se debe a que dicho dominio altera la localización de Nck en el pedestal se emplearon fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Nck1* y *Nck2* (*Nck1/2*) (Fig. 32). Las células deficientes en *Nck1/2* presentan una reducción drástica de pedestales con respecto a las células WT (Campellone and Leong 2005). Este tipo celular forma pedestales principalmente cuando es reconstituido con *Nck1* o *Nck2* (Gruenheid,

DeVinney *et al.* 2001). Por tanto, se efectuaron co-transfecciones de Flag-Nck2 y GFP vacío o de Flag-Nck2 y SH2-GFP de CrkII en fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Nck1/2*.



Para contrarrestar el bajo número de pedestales formados en las células deficientes en *Nck1/2*, la MOI empleada en estos experimentos fue incrementada con respecto a los experimentos realizados en otras líneas celulares. Las células transfectadas fueron

infectadas con EPEC preactivado, a una MOI de 225. La expresión de las proteínas fue analizada por WB con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Flag para reconocer Flag-Nck2 y el anticuerpo policlonal anti-GFP para reconocer GFP vacío o SH2-GFP (Fig. 32A). Como control de carga se empleó un anticuerpo que reconoce actina.

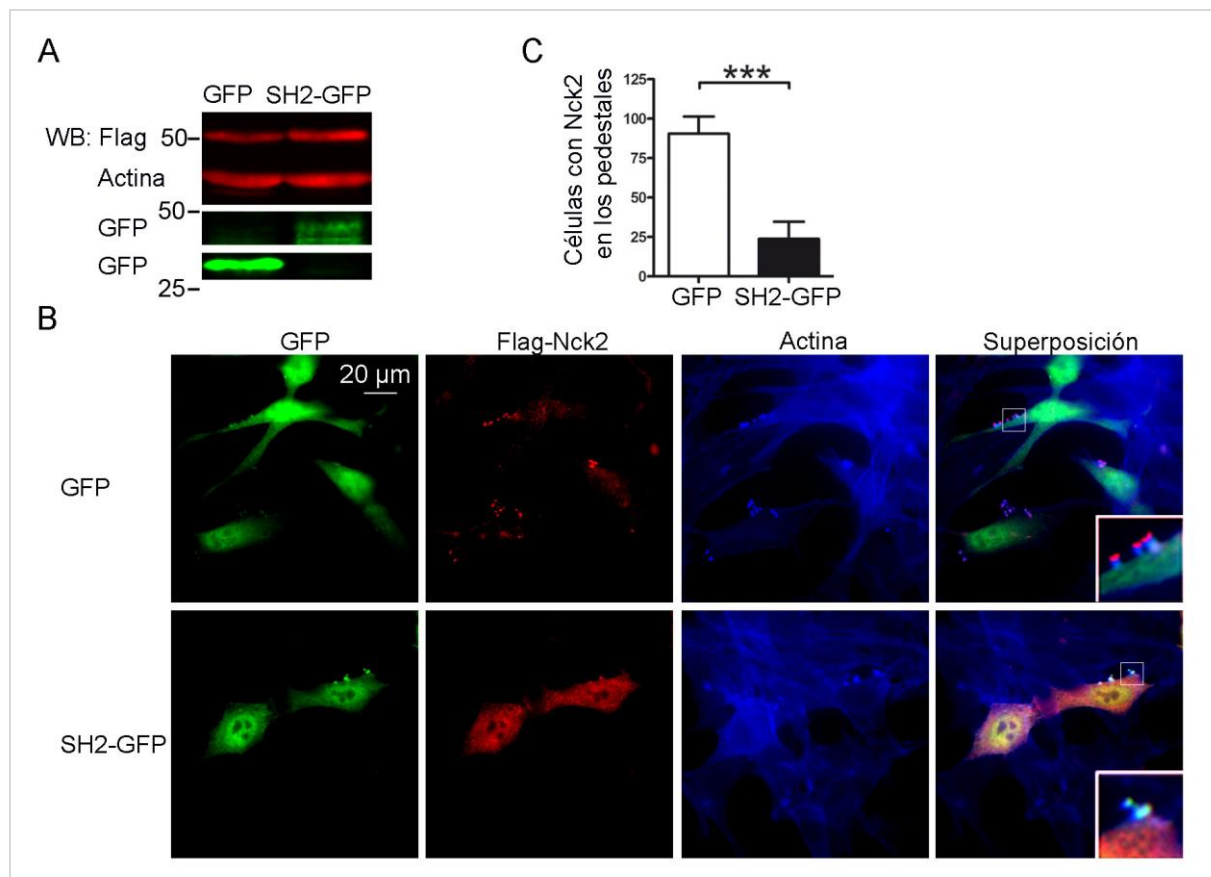


Figura 32. Efecto del dominio SH2 aislado de Crkl en la formación de pedestales de actina en células deficientes en Nck1/2 reconstituidas con Flag-Nck2. Los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Nck1/2* fueron co-transfectados con Flag-Nck2 y con GFP vacío (GFP) o con el dominio SH2 aislado de Crkl (SH2-GFP). Después de 20 horas de transfección las células fueron infectadas con EPEC preactivado, a una MOI de 225 durante 3 horas. **A)** Análisis por WB con un anticuerpo anti-Flag AcMo y anti-GFP policlonal de conejo empleando los lisados de las células transfectadas e infectadas. Como control de carga del WB se empleó anti-actina AcMo. **B)** Imágenes de la IFI de las células deficientes en Nck1/2 transfectadas con Flag-Nck2 y con GFP vacío o con SH2-GFP (en verde) e infectadas con EPEC. El citoesqueleto de actina se visualizó con faloidina Alexa Fluor 350. Flag-Nck2 fue detectado con el anticuerpo anti-Flag AcMo seguido de un anticuerpo secundario policlonal anti-ratón Alexa Fluor 568 (en rojo). La barra representa la escala de 20 μ m. Se muestran zoom digitales de 4 aumentos en las superposiciones. **C)** Cuantificación del número de células co-transfectadas que expresan Flag-Nck2 y GFP vacío o SH2-GFP y que presentan Flag-Nck2 en los pedestales. Se contaron un total de 42 células co-transfectadas en 3 experimentos independientes y se normalizó a 100 células. La gráfica muestra la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas según análisis *t*-Student; ***, $p < 0,001$.

La proteína Nck2 fusionada a Flag fue detectada por IFI con el anticuerpo anti-Flag seguido de un anticuerpo secundario policlonal anti-ratón Alexa Flúor 568 (Fig. 32B). El citoesqueleto de actina fue teñido con faloidina Alexa Flúor 350.

En las imágenes tomadas de la IFIs se observa que Nck2 se localiza principalmente en el pedestal en las células que expresan GFP vacío. Mientras que en las células que expresan SH2-GFP, Nck2 presenta una localización citoplasmática y no se concentra en la zona de los pedestales (Fig. 32B).

Las IFIs se emplearon para cuantificar el número de células co-transfectadas con Flag-Nck2 y GFP vacío o con Flag-Nck2 y SH2-GFP que presentaban Flag-Nck2 en los pedestales. El análisis estadístico de la cuantificación en tres experimentos independientes muestra que el número de células que presentan Nck2 en los pedestales es significativamente menor en células que expresan SH2-GFP en comparación a las células que expresan GFP vacío (Fig. 32C).

Estos resultados sugieren que el dominio SH2 de la proteína adaptadora CrkII podría inhibir la formación de pedestales bloqueando la localización de Nck2 en estas estructuras.

3. Análisis del estatus de fosforilación de CrkII y CrkL durante la infección por EPEC

La infección por EPEC promueve la activación de diferentes proteínas tirosina quinasas en la célula, entre las que se incluyen la proteína tirosina quinasa c-Fyn y la familia de proteínas tirosina quinasas Abl/Arg. Estas quinasas celulares fosforilan a la proteína efectora bacteriana Tir durante la infección por EPEC (Phillips, Hayward *et al.* 2004; Swimm, Bommarius *et al.* 2004). Además, las quinasas Abl/Arg son las principales proteínas tirosina quinasas que fosforilan a la familia de proteínas adaptadoras Crk en el residuo de tirosina regulatorio, el cual se localiza entre los dominios nSH3 y cSH3 (Feller, Knudsen *et al.* 1994; Ren, Ye *et al.* 1994; de Jong, ten Hoeve *et al.* 1997).

Por tanto, para determinar si la infección por EPEC provoca una variación en los niveles de fosforilación del residuo de tirosina regulatorio de CrkII y CrkL se analizó el estatus de esta modificación post-traducciona en células HeLa (Fig. 33). Para ello las células HeLa fueron infectadas durante 1 hora, 2 horas o 3 horas con EPEC preactivado, a una MOI de 3 y a una MOI de 45. Para disminuir los niveles basales de la señal de fosforilación de CrkII y CrkL en el residuo de tirosina regulatorio, las células HeLa se mantuvieron en medio sin suero durante las 16 horas previas a la infección. Como control de los niveles basales de fosforilación de las proteínas adaptadoras CrkII y CrkL se emplearon células HeLa sin infectar.

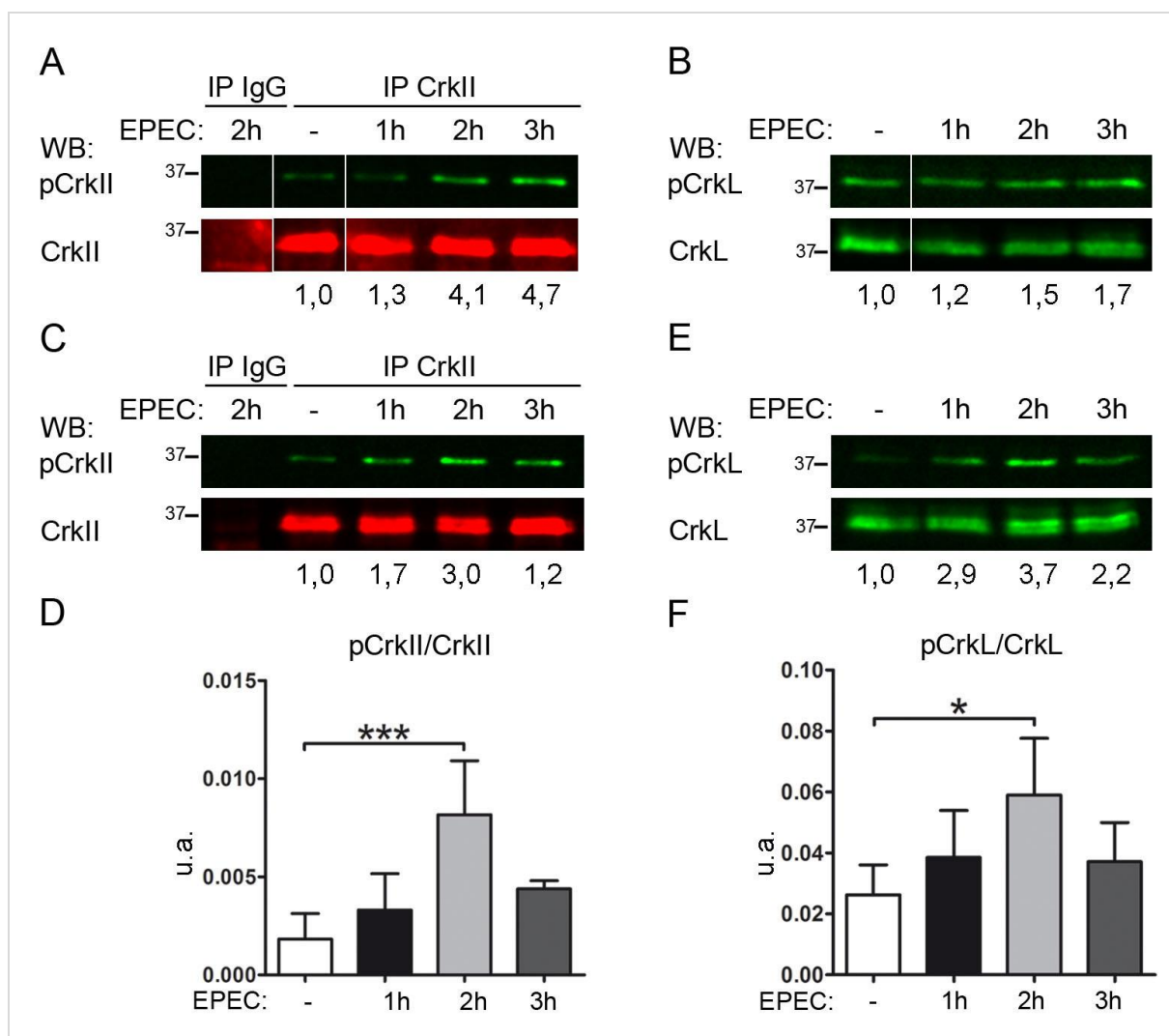


Figura 33. Análisis del estatus de fosforilación del residuo de tirosina regulatorio de CrkII y CrkL durante la infección por EPEC. Las células HeLa fueron mantenidas en medio sin suero durante 16 horas (h). A continuación las células fueron infectadas durante 1 hora, 2 horas o 3 horas con EPEC preactivado, a una MOI de 3 en A) y B) o a una MOI de 45 en C) y E). Los niveles basales de fosforilación de las proteínas CrkII y CrkL se analizaron en las células sin infectar (-). **A)** y **C)** Se efectuaron inmunoprecipitaciones (IP) con el anticuerpo anti-IgG AcMo como control de isotipo (IP IgG) y con el anticuerpo anti-Crk AcMo (IP CrkII) empleando los lisados de las células HeLa infectadas. Análisis por WB de las IPs con un anticuerpo policlonal de conejo fosfo-específico que reconoce la fosforilación en el residuo de tirosina 221 de CrkII (pCrkII). Para analizar los niveles de proteína total se usó un anticuerpo AcMo que reconoce CrkI/II. **B)** y **E)** Análisis de los lisados de las células infectadas por WB con un anticuerpo policlonal de conejo fosfo-específico que reconoce la fosforilación en el residuo de tirosina Y207 de CrkL (pCrkL), a continuación se llevó a cabo un *stripping* y se empleó un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce CrkL total. En A) y B) se muestra un WB representativo de los resultados obtenidos en 3 experimentos independientes, así como los valores del ratio de pCrkII/CrkII y pCrkL/CrkL en comparación con los niveles basales normalizados a 1. En D) y F) el análisis estadístico del ratio de las señales de pCrkII/CrkII y pCrkL/CrkL se llevó a cabo mediante análisis ANOVA de un factor y posterior test de Dunnett. Las gráficas muestran la media \pm SD de 4 experimentos independientes. u.a.: unidades arbitrarias. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Para detectar los niveles de fosforilación en el residuo de tirosina regulatorio de CrkII se efectuaron IPs de CrkII con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CrkII empleando los lisados de células HeLa infectadas por EPEC. Las IPs fueron analizadas por WB con un anticuerpo policlonal fosfo-específico que reconoce la fosforilación en el residuo de tirosina 221 de CrkII (pCrkII) (Fig. 33A y C).

Para detectar la fosforilación de CrkL en el residuo de tirosina regulatorio, los lisados de células HeLa infectados por EPEC fueron analizados por WB con un anticuerpo fosfo-específico que reconoce la fosforilación en el residuo de tirosina 207 de CrkL (pCrkL) (Fig. 33B y E). Además se empleó el anticuerpo monoclonal que reconoce CrkII y un anticuerpo policlonal que reconoce CrkL, para cuantificar los niveles de expresión total de cada proteína.

El análisis por WB con los anticuerpos fosfo-específicos muestra un incremento en la señal de fosforilación en el residuo de tirosina regulatorio de CrkII y CrkL durante la infección por EPEC, con un pico máximo de fosforilación después de 3 horas de infección a una MOI de 3 (Fig. 33A y B).

Asimismo, se llevó a cabo la cuantificación en el análisis por WB de los niveles de fosforilación en el residuo de tirosina regulatorio y de los niveles de proteína total de CrkII o CrkL durante la infección por EPEC a una MOI de 45, en cuatro experimentos independientes. Posteriormente se calculó el ratio entre la señal de la proteína fosforilada y la proteína total. A continuación se efectuó un análisis estadístico comparando los niveles de fosforilación de CrkII o CrkL durante la infección por EPEC a una MOI de 45, con los niveles basales de fosforilación de estas proteínas en las células sin infectar.

Los resultados del análisis estadístico revelan que la infección por EPEC induce un incremento significativo en los niveles de fosforilación del residuo de tirosina 221 de CrkII y del residuo de tirosina 207 de CrkL en comparación a los niveles basales. El pico máximo de fosforilación se produce a las 2 horas de infección a una MOI de 45 y disminuye a las 3 horas de infección en nuestras condiciones experimentales (Fig. 33D y F). Estos resultados indican que EPEC induce una fosforilación transitoria del residuo de tirosina 221 de CrkII y 207 de CrkL.

4. Localización de CrkII y CrkL fosforiladas tras la infección por EPEC

Como se ha comentado anteriormente, un estudio previo describió que CrkII se localiza en los pedestales de actina formados por EPEC (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Además, nuestros resultados indican que la infección por EPEC induce la fosforilación en el residuo de tirosina 221 de CrkII y 207 de CrkL (Fig. 33). Por tanto decidimos analizar la

localización de los adaptadores CrkII y CrkL fosforilados en el residuo de tirosina regulatorio en células infectadas por EPEC (Fig. 34-36).

Para comprobar por IFI la especificidad de los anticuerpos policlonales fosfo-específicos que reconocen pCrkII y pCrkL se inhibió la expresión de CrkI/II y CrkL mediante *siRNA* en células HeLa (Fig. 34). Como control de la inhibición, las células HeLa fueron tratadas con un oligonucleótido que no es capaz de inhibir la expresión de proteínas. Posteriormente las células HeLa fueron infectadas durante 3 horas con EPEC preactivado, a una MOI de 3. El uso de los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Crk* o *CrkL* fue descartado como control de la especificidad de los anticuerpos fosfo-específicos empleados para la IFI, ya que se observó una reacción cruzada elevada de los anticuerpos anti-pCrkII y anti-pCrkL en este tipo celular.

Los lisados celulares fueron analizados por WB con el anticuerpo anti-CrkII y el anticuerpo anti-CrkL (Fig. 34A). Como control de carga se utilizó un anticuerpo que reconoce tubulina. La señal de CrkII y CrkL fue cuantificada en el análisis por WB y normalizada con la señal de tubulina en cuatro experimentos independientes. El resultado de la cuantificación de CrkL y CrkII con respecto a tubulina revela una inhibición de la expresión del 56,3% para CrkII y del 39,6% para CrkL.

En paralelo, las células fueron fijadas y se emplearon para efectuar IFIs. Las IFIs se realizaron con anticuerpos fosfo-específicos que reconocen CrkII fosforilado en el residuo de tirosina 221 (Fig. 34B) o CrkL fosforilado en el residuo de tirosina 207 (Fig. 34C), los cuales fueron detectados con anticuerpos secundarios anti-conejo Alexa Flúor 488. El ADN de las bacterias y los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI.

Como se muestra en las imágenes de la Fig. 34B yC, pCrkII y pCrkL se localizan en la zona de infección próximos a las bacterias. Además, en las células HeLa en las que se inhibió la expresión de CrkII y CrkL mediante *siRNA* se observa una disminución de la señal de anti-pCrkII y anti-pCrkL en comparación a las células sin inhibir usadas como control. Esto demuestra que los anticuerpos policlonales anti-pCrkII y anti-pCrkL reconocen específicamente a las proteínas CrkII y CrkL fosforiladas en el residuo de tirosina regulatorio durante la infección por EPEC en células HeLa.

Estos resultados están en concordancia con los datos anteriores en los que se demuestra que la infección por EPEC incrementa la fosforilación del residuo de tirosina regulatorio de CrkII y CrkL con un pico máximo a las 3 horas de infección a una MOI de 3 y con un pico máximo a las 2 horas de infección a una MOI de 45 (Fig. 33).

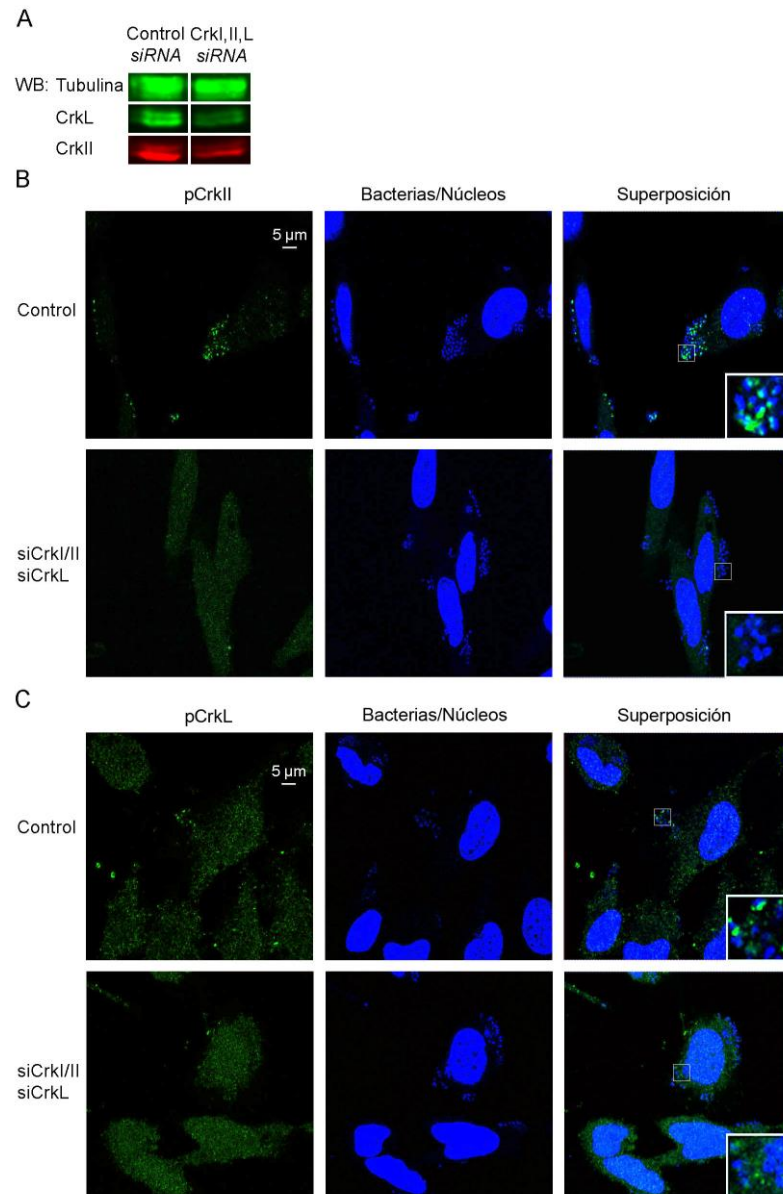


Figura 34. Control de la especificidad de los anticuerpos que reconocen el residuo de tirosina 221 de CrkII y el residuo de tirosina 207 de CrkL fosforilados. Se inhibió la expresión de CrkI/II y CrkL mediante *siRNA* en células HeLa. Como control se utilizaron células HeLa tratadas con un oligonucleótido que no inhibe la expresión de proteínas. Después de 20 horas de tratamiento, las células fueron infectadas con EPEC preactivado, a una MOI de 3 durante 3 horas. **A)** Análisis por WB con un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce CrkL y un anticuerpo anti-CrkII AcMo. Como control de carga se empleó anti-tubulina AcMo de rata. La señal de CrkL y CrkII fue normalizada con respecto a la señal de tubulina. La expresión de CrkL fue inhibida un 39,6% y la de CrkII fue inhibida un 56,3% haciendo la media en 4 experimentos independientes. Las células fijadas fueron empleadas para realizar inmunofluorescencias con anticuerpos policlonales de conejo fosfo-específicos que reconocen el residuo de tirosina fosforilado **B)** 221 de CrkII (pCrkII) o **C)** 207 de CrkL (pCrkL) seguido del anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (en verde). El ADN de las bacterias y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las imágenes fueron tomadas en planos de 1 μ m con un microscopio confocal Leica SP2/DM IRE2, se muestran los tres marcajes en el mismo plano. Se muestran zoom digitales de 4 aumentos en las superposiciones. La escala representa 5 μ m.

Para analizar mediante IFI la localización de las isoformas de la familia Crk fosforiladas en el residuo de tirosina regulatorio durante la infección por EPEC, las células HeLa fueron infectadas con EPEC durante 2 horas y 3 horas, a una MOI de 15 (Figs. 35 y 36). La MOI de 15 fue seleccionada debido a que a esta MOI se visualizan más fácilmente las isoformas CrkII y CrkL fosforiladas y la morfología de las células no está demasiado alterada por la infección. Para facilitar la detección de la señal de fosforilación, las células HeLa se mantuvieron en medio sin suero durante las 16 horas previas a la infección.

Las células infectadas y fijadas se emplearon para efectuar IFIs con los anticuerpos fosfo-específicos que reconocen la fosforilación en el residuo de tirosina 221 de CrkII o en el residuo de tirosina 207 de CrkL, seguidos del anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Flúor 488. El ADN de la bacteria y los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (Fig. 35).

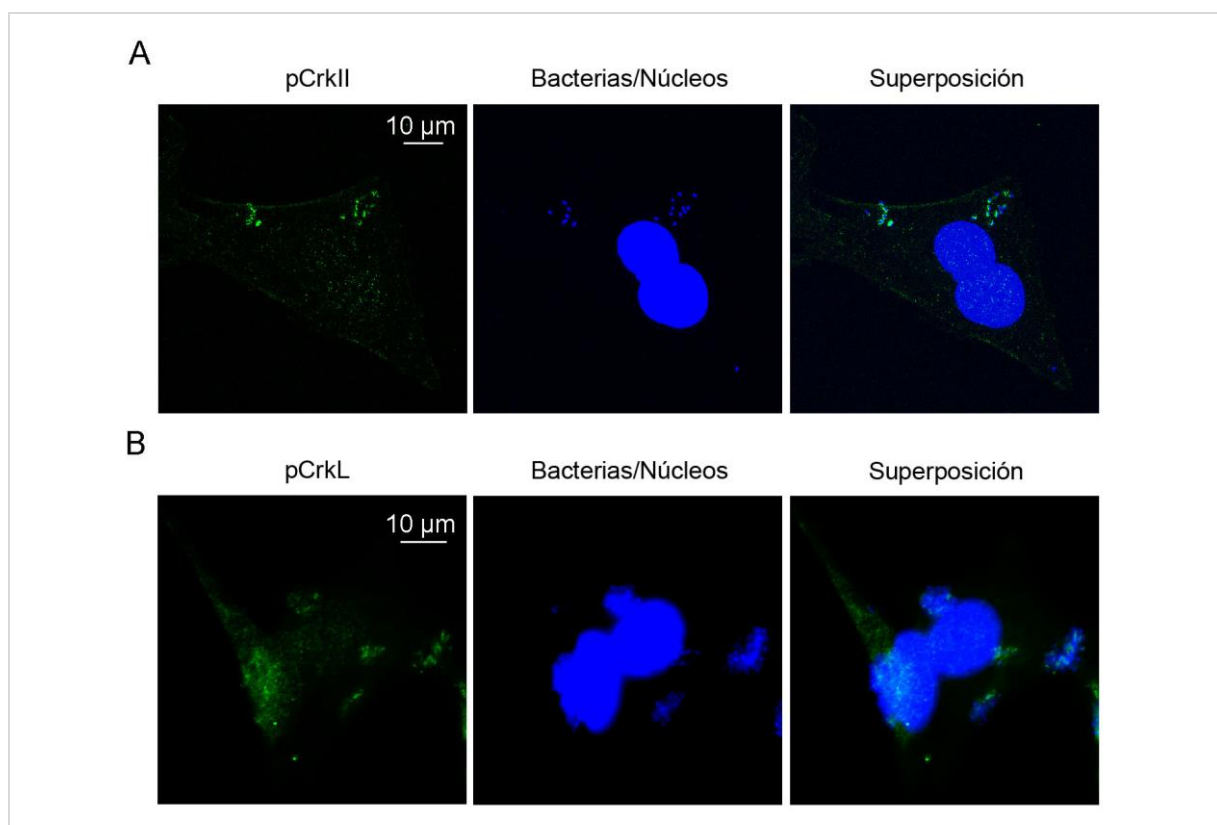
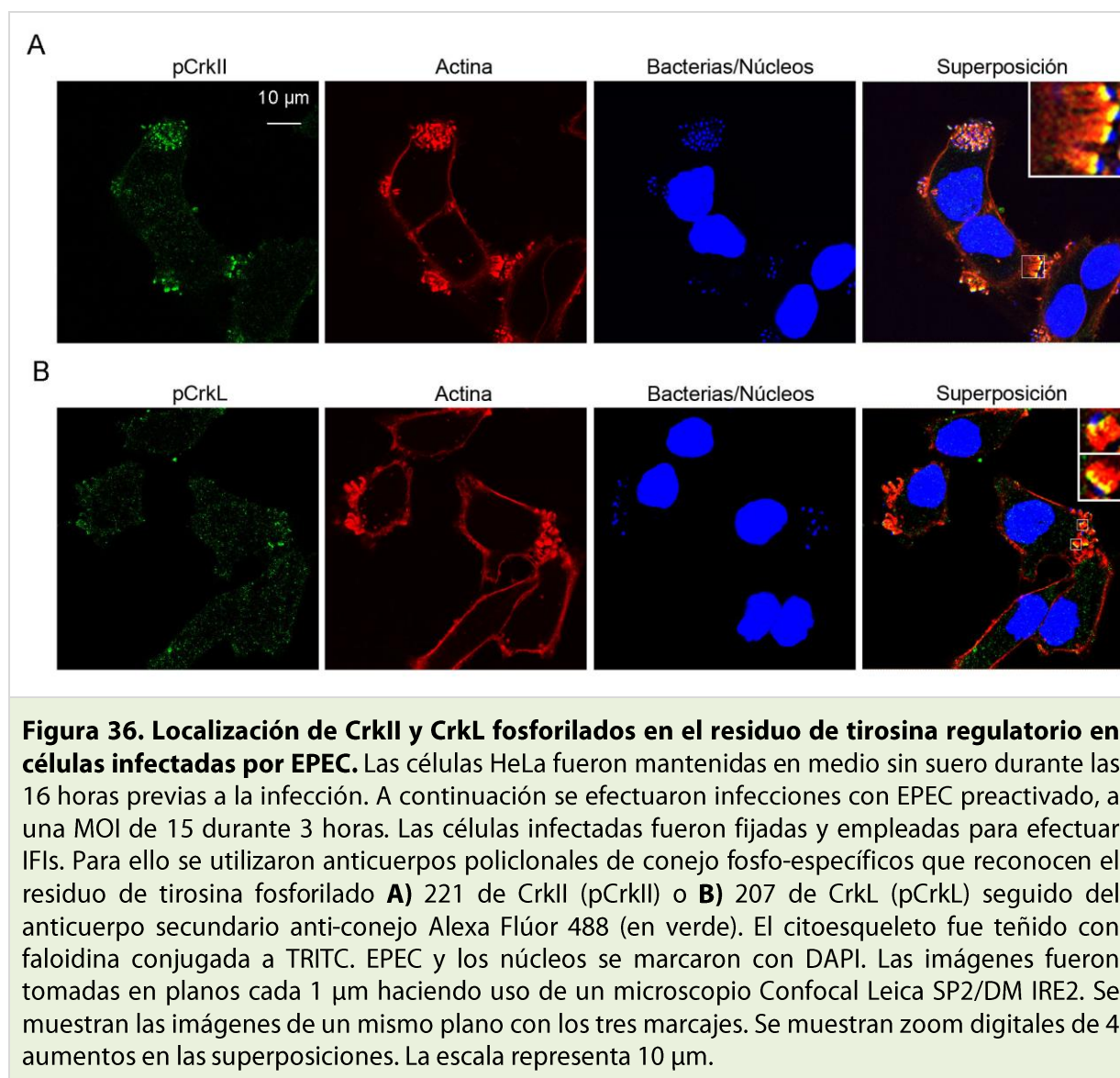


Figura 35. Localización de CrkII y CrkL fosforilados en el residuo de tirosina regulatorio en células infectadas por EPEC. Las células HeLa fueron mantenidas en medio sin suero durante las 16 horas previas a la infección. A continuación se efectuaron infecciones durante 2 horas con EPEC preactivado a una MOI de 15. Las células infectadas fueron fijadas y empleadas para efectuar IFIs. Para ello se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo fosfo-específicos que reconocen el residuo de tirosina fosforilado **A)** 221 de CrkII (pCrkII) o **B)** 207 de CrkL (pCrkL) seguido del anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Flúor 488 (en verde). El ADN de las bacterias y los núcleos celulares se marcaron con DAPI. Las imágenes en A) fueron tomadas en planos cada 1 μm haciendo uso de un microscopio Confocal Leica SP2/DM IRE2, se muestran las imágenes del mismo plano con los dos marcajes. La escala representa 10 μm.



En las IFIs con los anticuerpos fosfo-específicos empleando células HeLa infectadas con EPEC a una MOI de 15 se observó una señal más intensa en la fosforilación de CrkII y CrkL después de 3 horas de infección en comparación a 2 horas de infección. Por tanto se efectuó un análisis mediante microscopía confocal de las IFIs con anti-pCrkII y anti-pCrkL en las células HeLa infectadas por EPEC durante 3 horas a una MOI de 15 (Fig. 36). Además, el citoesqueleto de actina fue teñido con faloidina conjugada a TRITC. Asimismo, el ADN de la bacteria y los núcleos celulares fueron marcados con DAPI. Las IFIs con los tres marcajes fueron analizadas haciendo uso del microscopio confocal en distintos planos y se seleccionó un plano en el que se efectuó la superposición de las tres imágenes con el software Leica.

La superposición de las imágenes de los tres marcajes de la IFI muestra que CrkII fosforilado se localiza en los pedestales de actina formados por EPEC y principalmente en

la zona de contacto de la célula con la bacteria. Asimismo, la IFI efectuada con anti-pCrkL revela que CrkL fosforilado se encuentra en los pedestales de actina formados por EPEC con una localización similar a CrkII (Fig. 36).

5. Inhibición de la expresión de CrkL mediante *siRNA*

Previamente nuestro grupo observó que la ausencia de CrkI/II no provoca una variación significativa en el número de pedestales de actina formados por EPEC (Nieto-Pelegri 2013, UCM-Tesis doctoral). Sin embargo, el papel individual de CrkL en la formación de los pedestales de actina no había sido estudiado.

Por tanto, para determinar el papel de la isoforma CrkL en la inhibición de los pedestales formados por EPEC se silenció la expresión de esta proteína en células HeLa mediante *siRNA* (Fig. 37A). Para ello se empleó un oligonucleótido comercial específico que inhibe la expresión de CrkL. Como control de la inhibición, las células HeLa fueron tratadas con un oligonucleótido comercial que no es capaz de inhibir la expresión de proteínas. Después de 20 horas de tratamiento, las células HeLa fueron infectadas durante 3 horas con EPEC preactivado, a una MOI de 3.

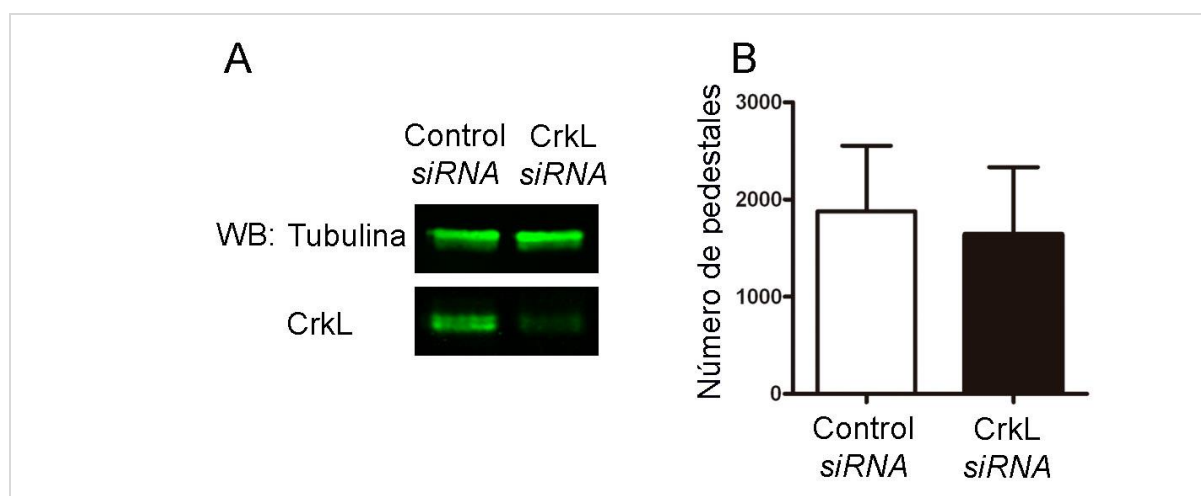


Figura 37. Efecto de la inhibición de CrkL en el número de pedestales formados en células HeLa infectadas por EPEC. Las células HeLa fueron inhibidas con *siRNA* de CrkL o con un oligonucleótido control. Después de 20 horas de tratamiento, las células fueron infectadas con EPEC preactivado, a una MOI de 3 durante 3 horas. **A)** Análisis por WB con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CrkL empleando los lisados de las células HeLa tratadas e infectadas con EPEC. Como control de carga se utilizó anti-tubulina AcMo de rata. La expresión de CrkL fue inhibida un 53% haciendo la media en 4 experimentos independientes. **B)** Se muestra la cuantificación del número de pedestales en las células HeLa tratadas con un oligonucleótido control (barra blanca) o inhibidas con *siRNA* de CrkL (barra negra) e infectadas con EPEC. La cuantificación fue realizada contando el número de pedestales en 100 células de cada condición en tinciones con faloidina TRITC y DAPI. La gráfica muestra la media \pm SD de 4 experimentos independientes. Las diferencias entre los grupos no son estadísticamente significativas según un análisis *t*-Student.

Los lisados celulares fueron analizados por WB con un anticuerpo que reconoce CrkL (Fig. 37A). Como control de carga se empleó un anticuerpo que reconoce tubulina. La señal de CrkL fue cuantificada en el análisis por WB y normalizada con la señal de tubulina. La media de la cuantificación de CrkL normalizado con la señal tubulina en cuatro experimentos independientes indica una inhibición de la expresión de CrkL de un 53% en comparación a las células HeLa tratadas con el control de la inhibición.

En paralelo, las células inhibidas e infectadas fueron fijadas y se emplearon para realizar tinciones. Para visualizar el citoesqueleto de actina se efectuaron tinciones con faloidina-TRITC. Los núcleos celulares y el ADN bacteriano fueron marcados con DAPI. Las tinciones se emplearon para cuantificar el número de pedestales de actina formados por EPEC en las células HeLa en las que se inhibió CrkL y en las células HeLa tratadas con el reactivo control de la inhibición.

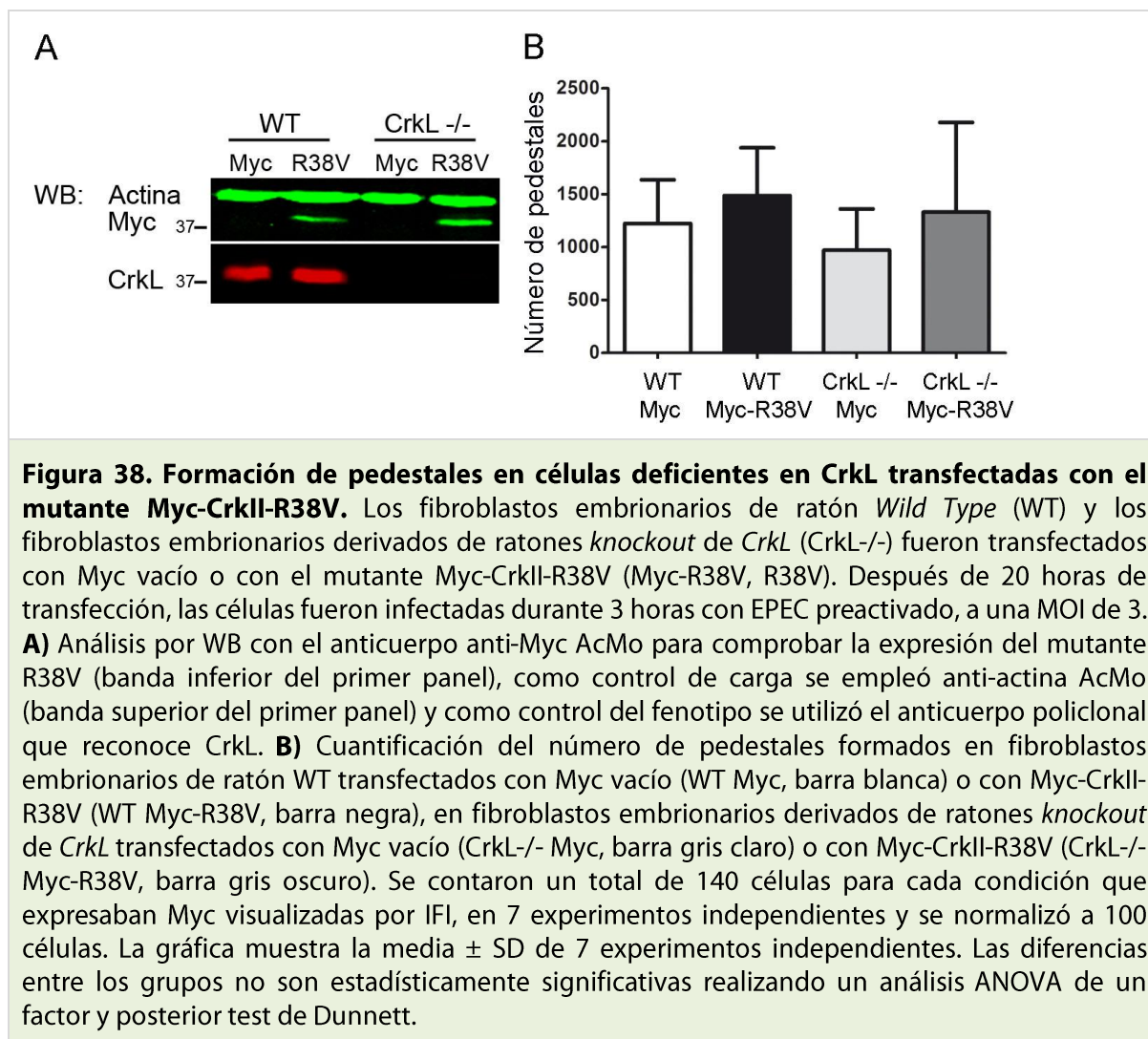
El análisis estadístico de la cuantificación de los pedestales de actina en cuatro experimentos independientes revela que no hay diferencias significativas en el número de pedestales en las células en las que se inhibió la expresión de CrkL en comparación a las células tratadas con el control de la inhibición (Fig. 37B). Este resultado indica que una reducción del 53% en la expresión de CrkL no afecta al número de pedestales de actina formados por EPEC.

6. Expresión del mutante CrkII R38V en células deficientes en CrkL

Para confirmar que la ausencia de CrkL no afecta al número de pedestales de actina formados tras la infección por EPEC se emplearon fibroblastos embrionarios de ratón WT y fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *CrkL* (Fig. 38).

Además para corroborar el papel inhibitorio de la familia de proteínas Crk en la formación de pedestales de actina, las células WT y células deficientes en CrkL fueron transfectadas con Myc vacío o con Myc-CrkII-R38V. Después de 20 horas de transfección, las células fueron infectadas durante 3 horas con EPEC preactivado a una MOI de 3.

Los lisados celulares fueron analizados por WB con un anticuerpo anti-Myc (Fig. 38A). En la Fig. 38A se muestra la expresión de Myc-CrkII-R38V en las células WT y en las células deficientes en CrkL. Para confirmar mediante WB que los fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en CrkL carecen de esta proteína, como es esperable, se empleó un anticuerpo anti-CrkL. La expresión de CrkL endógeno se observa únicamente en los lisados de las células WT, mientras que en los lisados de células CrkL^{-/-} transfectados con Myc-CrkII-R38V o con Myc vacío no se observa CrkL.



En paralelo se efectuaron IFIs con un anticuerpo anti-Myc para visualizar las células transfectadas. El citoesqueleto de actina se visualizó mediante la tinción con faloidina-TRITC. Como marcador del ADN bacteriano y de los núcleos celulares se empleó DAPI. Las IFIs fueron utilizadas para cuantificar el número de pedestales formados en las células transfectadas e infectadas por EPEC.

El análisis estadístico se llevó a cabo con los datos obtenidos de la cuantificación del número de pedestales en siete experimentos independientes. El análisis estadístico revela que no hay diferencias significativas en el número de pedestales de actina formados tras la infección por EPEC en los fibroblastos embrionarios de ratón WT comparado con las células deficientes en CrkL. Además, en las células WT y en las células deficientes en CrkL que sobreexpresan el mutante Myc-CrkII-R38V parece producirse un ligero aumento del número de pedestales, aunque los resultados no son estadísticamente significativos (Fig. 38B). Este resultado sugiere que la eliminación de todas las isoformas de Crk podría tener un efecto inhibitorio en la formación de pedestales de actina, en concordancia con los

resultados previos del grupo empleando células deficientes en Crkl/II (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral).

7. Análisis de los niveles de expresión de CrkII y CrkL

La ausencia o la inhibición de la expresión de la proteína CrkL no provoca una variación en el número de pedestales de actina formados por EPEC (Fig. 37 y 38), al igual que ocurre con Crkl/II (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral). Sin embargo, en ausencia de todas las isoformas de la familia de proteínas adaptadoras Crk se produce un aumento en el número de pedestales de actina (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral). Estos datos sugieren que las isoformas de la familia Crk podrían tener un papel redundante en la señalización del pedestal de actina.

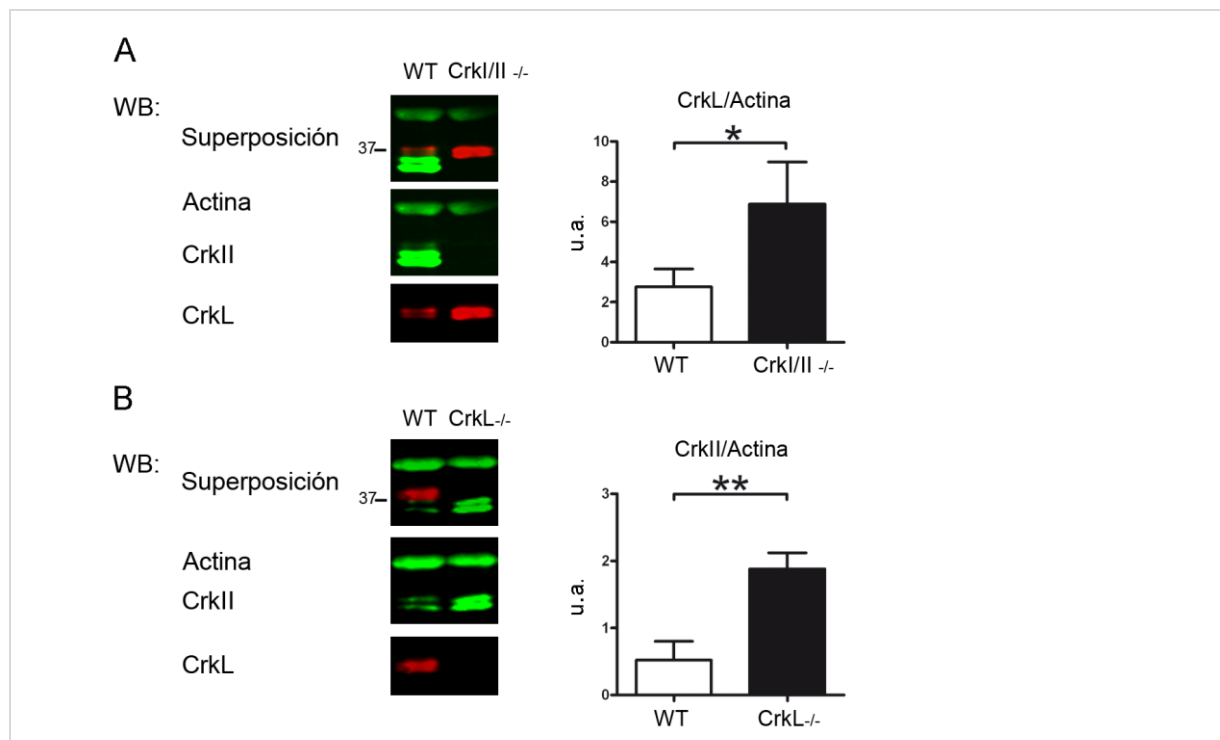


Figura 39. Análisis de la expresión de CrkII y de CrkL en células deficientes en Crkl/II y en células deficientes en CrkL. **A)** Análisis por WB con el anticuerpo anti-CrkII AcMo y el anticuerpo policlonal anti-CrkL empleando los lisados de fibroblastos embrionarios de ratón WT o los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Crkl/II* (*Crkl/II*^{-/-}). Como control de carga se utilizó anti-actina AcMo. La gráfica muestra la media \pm SD del ratio de las señales de CrkL/actina en células WT (barra blanca) o *Crkl/II*^{-/-} (barra negra) en 4 experimentos independientes. **B)** Análisis por WB con el anticuerpo anti-CrkII AcMo y el anticuerpo policlonal anti-CrkL empleando los lisados de fibroblastos embrionarios de ratón WT y los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *CrkL* (*CrkL*^{-/-}). Como control de carga se utilizó anti-actina AcMo. La gráfica muestra la media \pm SD del ratio de las señales de CrkII/actina en células WT (barra blanca) o *CrkL*^{-/-} (barra negra) en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico en A) y B) se efectuó mediante test *t*-Student. u.a.: unidades arbitrarias, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. Los experimentos en el apartado A) fueron efectuados por Elvira Nieto Pelegrín. El análisis por WB de los lisados en A) y el apartado B) fueron realizados por Eugenia Meiler.

Para determinar si se produce una variación de los niveles de expresión de las proteínas CrkII y CrkL en ausencia de alguna de las isoformas de la familia Crk se efectuó un análisis por WB de los lisados de fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Crk* o de *CrkL*. Los niveles de CrkII y CrkL fueron detectados con el anticuerpo anti-CrkII y con el anticuerpo anti-CrkL (Fig. 39).

El análisis estadístico de la cuantificación de los niveles de expresión obtenidos por WB en cuatro experimentos independientes revela que las células deficientes en CrkI/II presentan unos niveles basales de expresión de la isoforma CrkL significativamente mayores que las células WT (Fig. 39A). Asimismo, el análisis estadístico de la cuantificación de los niveles de expresión obtenidos por WB en tres experimentos independientes revela que las células deficientes en CrkL poseen unos niveles basales de expresión de la isoforma CrkII significativamente mayores que las células WT (Fig. 39B).

Este resultado indica que en ausencia de CrkII o de CrkL se produce una sobreexpresión de la isoforma restante. Esto podría explicar que los fibroblastos que expresan al menos una de estas isoformas no presenten diferencias significativas en el número de pedestales formados tras la infección por EPEC en comparación a las células WT (Nieto-Pelegín 2013, UCM-Tesis doctoral y Figs. 37, 38).

8. Análisis de la interacción del dominio SH2 de CrkII y CrkL con la proteína Tir

El dominio SH2 de la proteína adaptadora Nck interacciona con el residuo de tirosina 474 fosforilado de la proteína efectora bacteriana Tir (Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001). Dicha interacción promueve la principal ruta de polimerización de actina para la formación del pedestal, Tir-Nck-N-WASP.

Al igual que la proteína Nck, las proteínas adaptadoras de la familia Crk presentan un dominio SH2, el cual se localiza en los pedestales de actina (Fig. 31). Para analizar si el dominio SH2 presente en las proteínas CrkII y CrkL es capaz de interaccionar con la proteína efectora Tir se efectuaron ensayos PD (Fig. 40A). Para ello se expresó y purificó el dominio SH2 de CrkII (SH2-CrkII) y el dominio SH2 de CrkL (SH2-CrkL), ambos como proteínas de fusión a GST. En paralelo, se expresó y purificó el dominio SH2 de Nck (SH2-Nck) que se usó como control positivo de la interacción con la proteína efectora Tir. La expresión y purificación de las proteínas de fusión a GST fue comprobada efectuando una electroforesis SDS-PAGE y visualizando las proteínas por tinción con azul de Coomassie.

Posteriormente se efectuaron ensayos PD con las proteínas purificadas (SH2-Nck, SH2-CrkII, SH2-CrkL y GST vacío) empleando los lisados de células HeLa infectadas durante 1 hora o 2 horas con EPEC preactivado, a una MOI de 180 (Fig. 40A). En paralelo, como

control negativo de la interacción del dominio SH2 de CrkII y de CrkL con la proteína Tir se realizaron ensayos PD con lisados de células HeLa sin infectar. Además, como control negativo del ensayo PD se empleó GST vacío.

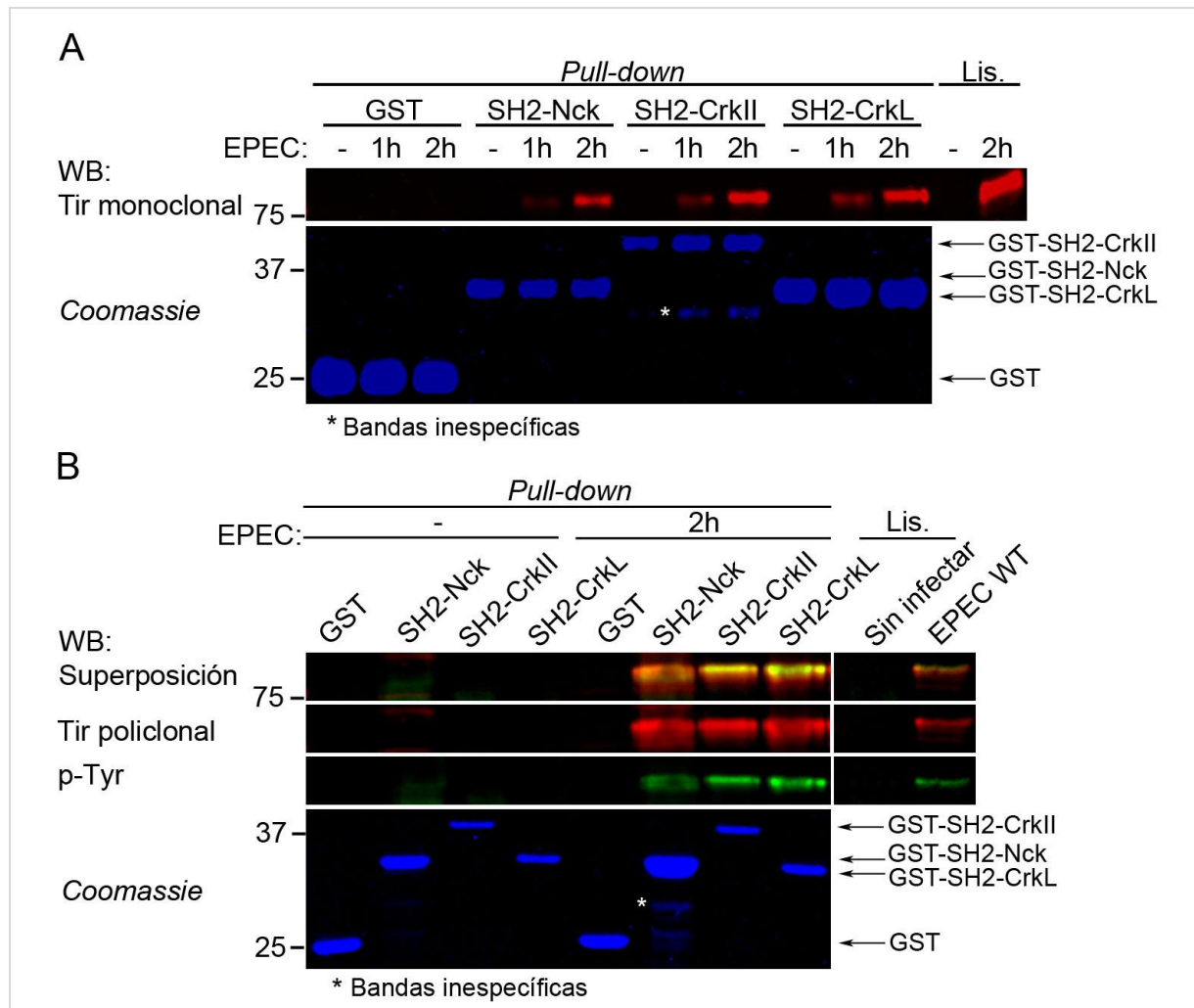


Figura 40. Análisis de la interacción del dominio SH2 aislado de CrkII y de CrkL con la proteína efectora Tir. Las células HeLa fueron infectadas con EPEC preactivado a una MOI de 180 durante 1 hora (1h) o 2 horas (2h) en A) y durante 2 horas en B). Como control se utilizaron células HeLa sin infectar (-). Los lisados de las células HeLa se utilizaron para efectuar ensayos PD empleando los dominios SH2 recombinantes fusionados a GST y purificados de CrkII y CrkL (GST-SH2-CrkII y GST-SH2-CrkL). Como control negativo de la interacción con Tir se utilizó GST vacío y como control positivo se utilizó GST-SH2-Nck. **A)** Análisis de los PD por WB con un anticuerpo AcMo que reconoce la proteína efectora Tir. Como control de la cantidad de proteína recombinante empleada en los ensayos PD se efectuó una electroforesis de una fracción 1:20 de cada ensayo y se visualizó por tinción con azul de Coomassie. Se muestra una fracción 1:10 del lisado empleado en los ensayos PD. **B)** Análisis de los ensayos PD por WB con un anticuerpo policlonal que reconoce Tir y un anticuerpo AcMo que reconoce residuos de tirosina fosforilados (p-Tyr). Como control de la cantidad de proteína recombinante empleada en los ensayos PD se efectuó una electroforesis de una fracción 1:40 de cada ensayo y se visualizó por tinción con azul de Coomassie. Se muestra una fracción 1:20 del lisado empleado en los ensayos PD. Estos experimentos fueron realizados 8 veces en A) y 4 veces en B). Se señala con flechas las proteínas recombinantes empleadas en el PD. El asterisco (*) señala bandas inespecíficas. Lis. Lisado.

Los ensayos PD fueron analizados por WB con un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal que reconoce Tir (Fig. 40A y B). Para verificar la cantidad de cada proteína empleada en el ensayo PD se llevó a cabo una tinción con azul de *Coomassie* de una fracción 1/20 de cada ensayo PD.

Como se puede observar en la Fig. 40A, el análisis por WB revela que tanto el dominio SH2 de CrkII como el dominio SH2 de CrkL son capaces de interaccionar eficientemente con la proteína bacteriana Tir, de forma similar al dominio SH2 de la proteína adaptadora Nck. Estos resultados sugieren que CrkII y CrkL podrían interaccionar con la proteína efectora Tir durante la infección por EPEC (Fig. 40A).

El dominio SH2 presente en CrkII y CrkL reconoce e interacciona con residuos de tirosina fosforilados (Mayer and Hanafusa 1990). Por tanto, se analizó si la fracción de Tir que interacciona con el dominio SH2 de CrkII y de CrkL está fosforilada en residuos de tirosina. Para ello se realizaron ensayos PD con el dominio SH2 recombinante de CrkII y de CrkL fusionado a GST y se emplearon los lisados de células HeLa infectadas durante 2 horas con EPEC preactivado, a una MOI de 180. Como control se realizó el ensayo con lisados de células HeLa sin infectar. Los ensayos PD fueron analizados por WB con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina genérico (p-Tyr) (Fig. 40B). A continuación, para confirmar que la proteína efectora Tir está fosforilada en residuos de tirosina la membrana fue reincubada con un anticuerpo policlonal anti-Tir (Fig. 40B). La superposición del análisis por WB con los anticuerpos anti-Tir y anti-p-Tyr revela que la banda de la proteína Tir se superpone con la banda de fosfotirosina (Fig. 40B). Este resultado indica que al menos una fracción de la proteína Tir que se une al dominio SH2 de CrkII y CrkL se encuentra fosforilada en residuos de tirosina.

Por otra parte, el mutante de Tir no fosforilable en el residuo de tirosina 474 (Y474F) es incapaz de unirse al dominio SH2 de la proteína adaptadora Nck (Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001). Por tanto, para comprobar si la fosforilación en el residuo de tirosina 474 de la proteína bacteriana Tir es necesaria para la interacción con el dominio SH2 presente en CrkII y de CrkL se realizaron infecciones con una cepa de EPEC que expresa el mutante de la proteína Tir no fosforilable en la posición 474 (Fig. 41A).

La construcción que codifica para el mutante de Tir Y474F fue cedida por Brendan Kenny y transformada por Elvira Nieto Pelegrín en una cepa de EPEC deficiente en Tir (Δ *tir* EPEC). Esta cepa fue complementada con el plásmido de baja copia que codifica para la proteína mutante de Tir que presenta una sustitución en el residuo de tirosina 474 a fenilalanina y por tanto no es fosforilable en dicha posición (ptirY474F). Las infecciones

fueron efectuadas en células HeLa durante 2 horas con la cepa mutante de EPEC ptirY474F preactivada, a una MOI de 150.

Los lisados de células HeLa infectadas con EPEC ptirY474F fueron empleados para efectuar ensayos PD con el dominio SH2 de CrkII y de CrkL. En paralelo, como control positivo de la interacción de la proteína efectora Tir con el dominio SH2 de CrkII y de CrkL se efectuaron ensayos PD con lisados de células HeLa infectadas con EPEC WT o con una cepa de EPEC deficiente en Tir (Δtir EPEC) reconstituida con una construcción que codifica para Tir (ptir), empleando las mismas condiciones de infección que la cepa EPEC ptirY474F. Como control negativo de la interacción de la proteína Tir con el dominio SH2 de las proteínas CrkII y CrkL se efectuaron ensayos PD con lisados de células HeLa sin infectar.

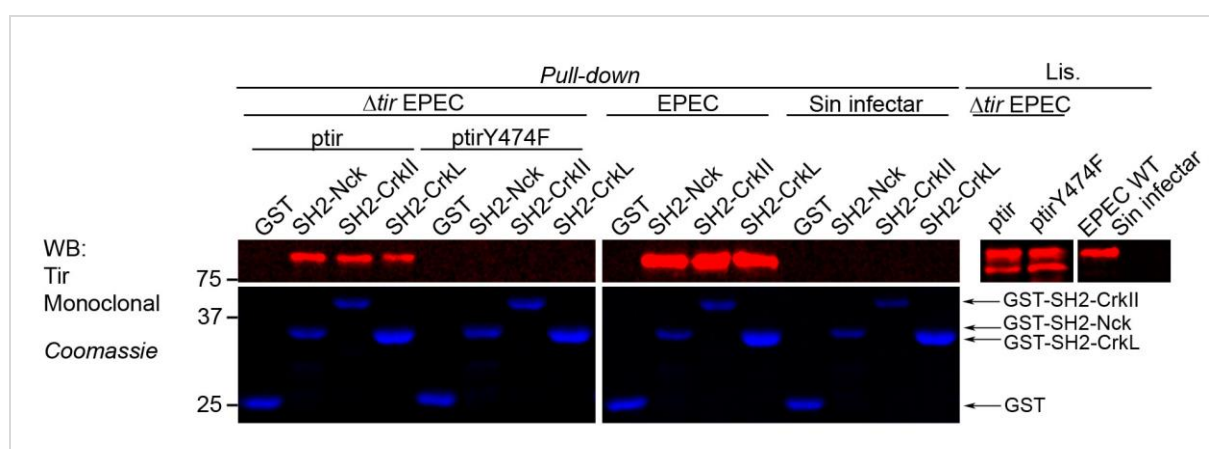


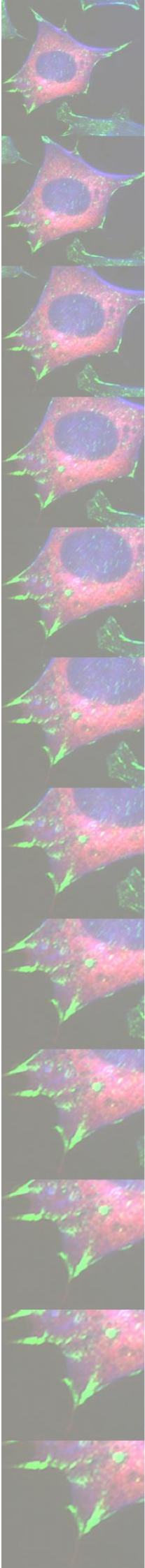
Figura 41. Análisis de la interacción del dominio SH2 de CrkII y de CrkL con la proteína efectora Tir en células infectadas con una cepa de EPEC que expresa un mutante de Tir no fosforilable en la posición 474. A) Las células HeLa fueron infectadas a una MOI de 150 durante 2 horas con una cepa mutante de EPEC deficiente en Tir (Δtir EPEC) complementada con un plásmido de baja copia que codifica para Tir (ptir) o un mutante no fosforilable de Tir, Tyr474Phe (ptirY474F), producidas por Elvira Nieto Pelegrín. En paralelo, como control se utilizaron células HeLa sin infectar o células infectadas con EPEC WT. Los lisados de las células infectadas y sin infectar fueron utilizados en ensayos PD empleando proteínas recombinantes purificadas: GST vacío, GST-SH2-Nck, GST-SH2-CrkII y GST-SH2-CrkL. Se muestra el análisis de los PD por WB con un anticuerpo anti-Tir AcMo. Como control de la cantidad de proteína recombinante empleada en los ensayos PD se efectuó una electroforesis de una fracción 1:20 de cada ensayo y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. Se señala con flechas las proteínas recombinantes empleadas en el PD. Estos experimentos fueron realizados 4 veces. Se muestra una fracción 1:20 de los lisados empleados en los ensayos PD. Lis. Lisado.

Los ensayos PD fueron analizados por WB con un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína Tir. Como se puede observar en la Fig. 41A, el dominio SH2 de CrkII y de CrkL no interacciona con la proteína efectora mutante de Tir no fosforilable en la posición 474. Mientras que en los ensayos PD en los que se emplearon los lisados de células HeLa infectadas con EPEC WT o con la cepa de EPEC reconstituida con Tir (Δtir +ptir), el dominio SH2 de CrkII y de CrkL es capaz de interaccionar con la proteína

efectora Tir, de forma similar al dominio SH2 de Nck usado como control. Este resultado indica que la interacción del dominio SH2 de CrkII y de CrkL con la proteína efectora Tir es dependiente de la fosforilación en el residuo de tirosina 474 de Tir.

Estos resultados sugieren que el dominio SH2 presente en las proteínas adaptadoras CrkII y CrkL podría interaccionar con el residuo de tirosina 474 fosforilado de la proteína efectora Tir, al igual que el dominio SH2 de la proteína adaptadora Nck. De esta forma, las proteínas de la familia Crk podrían competir con la proteína adaptadora Nck por la interacción con la proteína efectora Tir, lo cual podría bloquear la ruta Tir-Nck-N-WASP y explicaría el papel inhibitorio de las proteínas adaptadoras Crk en la formación de pedestales (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral y Fig. 31).

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Cortactina y la familia de proteínas adaptadoras Crk están implicadas en el remodelado del citoesqueleto actina debido a su participación en procesos como la migración celular, la dinámica de las adhesiones focales, así como en la infección por diversos patógenos.

La infección por EPEC promueve la formación de unas estructuras ricas en actina denominadas pedestales. En estas estructuras se localizan numerosas proteínas implicadas en la regulación de la polimerización de actina tales como cortactina, Crkl, talina y vinculina, entre otras (Cantarelli, Takahashi *et al.* 2000; Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Por ello la infección por EPEC se ha empleado como modelo para estudiar el papel de numerosas proteínas en la dinámica de actina (Hayward, Leong *et al.* 2006).

Cortactina está regulada por fosforilación en residuos de tirosina y por acetilación en residuos de lisina (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004; Zhang, Yuan *et al.* 2007). En la presente tesis doctoral se ha estudiado la relación de estas modificaciones post-traduccionales, la cual podría tener una importante repercusión en la actividad de cortactina durante procesos como el *spreading* celular y la infección por patógenos.

Por otra parte, nuestro grupo previamente había determinado que la familia de proteínas adaptadoras Crk presentan un papel inhibitorio y redundante en los pedestales formados por EPEC (Nieto-Pelegri 2013, UCM-Tesis doctoral). Por tanto, en el presente estudio se ha determinado el mecanismo por el cual la familia de proteínas adaptadoras Crk podría inhibir los pedestales de actina formados por EPEC.

La fosforilación de cortactina en residuos de tirosina impide su acetilación e inhibe el *spreading* celular

Cortactina es una proteína clave en la dinámica del citoesqueleto de actina y está implicada en múltiples procesos celulares como migración celular, endocitosis, metástasis de células tumorales, entre otros (revisado en (Ammer and Weed 2008)). Cortactina está regulada por fosforilación en residuos de tirosina y serina (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004). Además, en varios tipos de cáncer se han observado variaciones en los niveles de fosforilación de cortactina en residuos de tirosina (Jia, Uekita *et al.* 2008).

Cortactina fue inicialmente identificada como el principal sustrato de la proteína tirosina quinasa Src (Wu, Reynolds *et al.* 1991). Sin embargo, las implicaciones fisiológicas de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina no habían sido esclarecidas completamente. Esto se debe en gran parte a que los niveles endógenos de cortactina

fosforilada en residuos de tirosina son difíciles de detectar. Además, para estudiar el papel de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina, en numerosos estudios se han empleado diferentes factores de crecimiento como FGF o EGF que dan lugar a resultados poco repetitivos (Maa, Wilson *et al.* 1992; Zhan, Hu *et al.* 1993).

Por tanto, en la presente tesis doctoral nos planteamos la necesidad de emplear un sistema eficiente de fosforilación de cortactina en residuos de tirosina que nos permitiera clarificar la función de esta modificación post-traducciona a nivel celular. Para ello hemos utilizado un sistema denominado *Functional Interaction Trap* (FIT) diseñado y cedido por el grupo del Dr. Bruce J. Mayer (Sharma, Antoku *et al.* 2003). El FIT ha sido empleado previamente para promover la fosforilación por la proteína tirosina quinasa Src de distintos sustratos, como p130Cas (Sharma and Mayer 2008).

Para estudiar los efectos fisiológicos de la fosforilación en residuos de tirosina de determinadas proteínas se han empleado diversas estrategias, algunas similares al sistema FIT. En un estudio, la proteína tirosina quinasa Hck (*Hemopoietic cell kinase*) perteneciente a la familia de las SFKs fue modificada para alterar la especificidad de sustrato mediante la sustitución de los dominios SH3 y SH2 por un dominio PDZ (*Post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disk large tumor suppressor* (DlgA), and *Zonula occludens-1 protein* (zo-1) (Yadav, Yeh *et al.* 2009). En otro trabajo, para incrementar los niveles de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina se empleó un mutante de la proteína tirosina quinasa Src sensible a la temperatura (Kelley, Ammer *et al.* 2010). Además, recientemente se ha utilizado una técnica denominada RapRTAP (*Rapamycin-Regulated Targeted Activation of Pathways*) para activar selectivamente a la proteína tirosina quinasa Src y estudiar su papel en los complejos proteicos Src-FAK y Src-p130Cas implicados en la motilidad y morfología celular (Karginov, Tsygankov *et al.* 2014).

En la presente tesis doctoral se ha demostrado que la proteína tirosina quinasa Src fosforila eficientemente a cortactina en residuos de tirosina mediante el sistema FIT en los fibroblastos embrionarios de ratón SYF, Rsrc y en las células epiteliales humanas HeLa (Fig. 11 y 17). Las células SYF carecen de las principales proteínas tirosina quinasas de la familia Src (Src, Yes y Fyn), por lo que representan un sistema biológico ideal para estudiar las implicaciones funcionales de la fosforilación de cortactina por la proteína tirosina quinasa Src mediante el sistema FIT. Además, este tipo celular presenta defectos en la migración celular (Sharma and Mayer 2008). Como control del sistema FIT en las células SYF se emplearon las células Rsrc. Por otra parte, las células HeLa presentan niveles basales muy bajos de fosforilación de cortactina en residuos de tirosina que son prácticamente

indetectables mediante análisis por WB estándar (Fig. 17), lo cual las hace adecuadas para el empleo del sistema FIT.

La proteína tirosina quinasa Src fosforila a cortactina de ratón en los residuos de tirosina 421, 466, 482 y 485 (Huang, Liu *et al.* 1998). La fosforilación por la quinasa Src en el residuo de tirosina 485 de cortactina es menor que en los otros residuos de tirosina descritos (Huang, Liu *et al.* 1998), por lo que no se ha analizado en la presente tesis doctoral. Mediante técnicas de espectrometría de masas se ha descrito que el residuo de tirosina 475 de cortactina también es susceptible de fosforilación, aunque aún no se conoce la quinasa responsable de fosforilar dicha posición (Martin, Jeffery *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la sobreexpresión de cortactina y la proteína tirosina quinasa Src, fusionadas a los dominios Zip complementarios del sistema FIT, provoca un incremento de la fosforilación de cortactina transfectada en los residuos de tirosina 421 y 466 (Fig. 11 y 13). La fosforilación de los otros residuos de tirosina de cortactina susceptibles de ser fosforilados, mencionados anteriormente, no se ha podido analizar, ya que actualmente no hay anticuerpos comerciales disponibles que reconozcan dichas posiciones.

La fosforilación de cortactina por la quinasa Src mediante el sistema FIT es específica, ya que la sobreexpresión de la quinasa Src mediante el sistema FIT no parece aumentar los niveles de fosforilación en residuos de tirosina de otras proteínas (Fig. 14). Asimismo, no se observa un incremento en la fosforilación del residuo de tirosina 118 de paxilina, que es otro de los sustratos de la proteína tirosina quinasa Src (Fig. 15). Además, cortactina es fosforilada por la tirosina quinasa Src mediante el sistema FIT fundamentalmente en los residuos de tirosina previamente descritos, ya que no se detecta fosforilación en el triple mutante de cortactina (Y421, 466 y 482F) (Fig. 16).

En la presente tesis doctoral se ha demostrado que la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina parece tener una relación inversa con su acetilación en residuos de lisina (Fig. 18-21). Además, en ausencia de la sobreexpresión de la quinasa Src del sistema FIT, al menos una proporción de cortactina transfectada es acetilada en las células (Fig. 18) y por tanto esta fracción estaría inactiva según lo descrito (Zhang, Yuan *et al.* 2007).

Cortactina también es susceptible de ser ubiquitinada en residuos de lisina, lo cual es necesario para su degradación por el proteosoma (Zhao, Wei *et al.* 2012). El tratamiento de las células HeLa con TSA incrementa la acetilación de cortactina en residuos de lisina, lo cual podría impedir su ubiquitinación y su posterior degradación por el proteosoma. Este mecanismo de estabilización proteica ha sido descrito en otras proteínas (Caron, Boyault *et al.* 2005). Por otro lado, la fosforilación de cortactina promueve la degradación por

calpaína (Huang, Tandon *et al.* 1997; Perrin, Amann *et al.* 2006). En definitiva, estas modificaciones post-traduccionales de cortactina podrían regular los niveles de proteína en la célula, así como su actividad.

La deacetilasa HDAC6 fue inicialmente identificada como la principal enzima capaz de deacetilar a cortactina (Zhang, Yuan *et al.* 2007). Posteriormente se ha descrito que cortactina es sustrato de las deacetilasas SIRT1 (Zhang, Zhang *et al.* 2009) y HDAC8 (Li, Chen *et al.* 2014). Por tanto, sería interesante analizar los niveles de acetilación y fosforilación en residuos de tirosina de cortactina en células en las que estas enzimas fueran inhibidas.

Basándose en el análisis del modelado de la estructura tridimensional de cortactina, Yang *et al.* 2008 destacan que la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina podrían estar relacionadas entre sí (Yang and Seto 2008). Dicho modelado revela que el residuo de lisina 203 de cortactina, susceptible de acetilación, estaría espacialmente próximo al residuo de tirosina 421. Mientras que los residuos de lisina 309 y 319 estarían próximos al residuo de tirosina 466 susceptible de fosforilación por la quinasa Src (Yang and Seto 2008). Estos hallazgos teóricos están en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en la presente tesis doctoral, los cuales demuestran que estas modificaciones no ocurren simultáneamente en la molécula de cortactina (Fig.18-21).

Además, un estudio reciente ha demostrado que la sobreexpresión del mutante mimético de deacetilación incrementa significativamente los niveles de fosforilación de cortactina en el residuo de tirosina 421 en comparación al mutante que mimetiza cortactina acetilada o a cortactina WT en células HEK 293FT (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) (Catarino, Ribeiro *et al.* 2013). Asimismo, el mutante mimético de cortactina acetilada interacciona con menor eficiencia con la proteína tirosina quinasa Src y con otros sustratos de unión a su dominio SH3. En el mismo estudio demuestran que la acetilación de cortactina parece regular su redistribución en las células neuronales. Estos resultados apoyan nuestros datos obtenidos previamente que demuestran una competición entre la fosforilación y la acetilación de cortactina.

Otro estudio también ha confirmado la relación inversa entre la fosforilación y la acetilación de cortactina, la cual parece estar regulada en parte por la inestabilidad de los microtúbulos (Biosse Duplan, Zalli *et al.* 2014). Los autores sugieren que el balance fosforilación/acetilación de cortactina podría controlar la estabilidad del cinturón de podosomas y la interacción de los microtúbulos con los podosomas en los osteoclastos.

Nuestros resultados y los estudios posteriores citados sugieren que el balance entre la fosforilación en residuos de tirosina y la acetilación de cortactina parece regular la unión a actina-F, así como su interacción con diversos sustratos. Además, la relación inversa de estas modificaciones post-traduccionales podría tener una importante repercusión en diversos campos de estudio entre los que se incluye la patogénesis bacteriana (revisado en (Yang and Gregoire 2007)).

Uno de los hallazgos más importantes de este trabajo ha sido el descubrimiento de que cortactina fosforilada en residuos de tirosina altera la dinámica del *spreading* celular (Figs. 23 y 24). El papel de cortactina en el *spreading* celular había sido estudiado previamente por varios grupos con resultados contradictorios, probablemente debido a diferencias metodológicas (Illes, Enyedi *et al.* 2006; van Rossum, Moolenaar *et al.* 2006). Por tanto era necesario clarificar el papel que desempeña cortactina durante el *spreading* celular.

En la presente tesis doctoral se ha demostrado que cortactina fosforilada en residuos de tirosina inhibe el *spreading* celular mientras que cortactina sin fosforilar lo favorece. Este efecto es más relevante en células Rsrc que en células SYF (Figs. 23 y 24). Esto podría deberse a que las células SYF carecen de las principales proteínas tirosina quinasas de la familia Src. Además, se ha descrito que la ausencia de la proteína tirosina quinasa Src provoca un retraso en el *spreading* celular en fibroblastos embrionarios de ratón (Kaplan, Swedlow *et al.* 1995; Klinghoffer, Sachsenmaier *et al.* 1999). Esto se debe a que la proteína tirosina quinasa Src fosforila, además de a cortactina, a numerosas proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina y en la dinámica de las adhesiones focales, como la proteína paxilina (Li, Okura *et al.* 2002).

En este estudio también habría sido relevante analizar el efecto de cortactina fosforilada en residuos de tirosina durante el *spreading* en células HeLa. Esto confirmaría que la inhibición del *spreading* por cortactina fosforilada en residuos de tirosina no es un fenotipo exclusivo de las células Rsrc.

Los datos obtenidos en este trabajo indican de forma cualitativa que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src mediante el sistema FIT provoca una disminución del número de adhesiones focales en células SYF y Rsrc (Fig. 26), empleando vinculina como marcador (Geiger 1979). Por el contrario las células que únicamente sobreexpresan cortactina presentan un mayor número de adhesiones focales con respecto a las células control (Fig. 26). Nuestros resultados estarían en concordancia con lo demostrado mediante la sobreexpresión *in vivo* del mutante mimético de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina (Y421, 482 y 466E). Dicho mutante

induce un incremento en la migración celular, así como en la dinámica de las adhesiones focales y promueve el desensamblaje de las fibras de estrés (Kruchten, Krueger *et al.* 2008). Por tanto, la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina podría afectar a la estabilidad de las adhesiones focales para promover la migración celular.

Cortactina fosforilada en residuos de tirosina parece alterar la localización de vinculina en las adhesiones focales (Fig. 26). Por lo que una cuestión relevante sería analizar si cortactina está implicada en la activación de vinculina y si estas proteínas son capaces de interaccionar directa o indirectamente.

Varios estudios han descrito que cortactina endógena fosforilada en residuos de tirosina se localiza en las adhesiones focales (Jia, Uekita *et al.* 2008; Wang, Chen *et al.* 2008; Wang, Liu *et al.* 2011). Probablemente la fosforilación de cortactina con el sistema FIT aumenta la dinámica de las adhesiones focales afectando a la localización de cortactina en estas estructuras. Un control importante del sistema FIT consistiría en revertir la inhibición del *spreading* celular causada por la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina. Para ello se podría estabilizar la localización de cortactina en las adhesiones focales añadiendo el dominio FAT (*Focal Adhesion Targeting*) de la proteína tirosina quinasa FAK a la construcción de cortactina del sistema FIT. El dominio FAT de la proteína tirosina quinasa FAK es necesario para la localización de esta quinasa en las adhesiones focales (Hildebrand, Schaller *et al.* 1993). En un estudio previo se ha utilizado una quimera similar para restaurar la localización de Src en las adhesiones focales (Yeo, Partridge *et al.* 2006). El dominio FAT fusionado a cortactina podría favorecer la localización de cortactina en las adhesiones focales contrarrestando el efecto de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina. La reversión del fenotipo de inhibición del *spreading* celular mediante esta estrategia confirmaría que cortactina fosforilada en residuos de tirosina estaría implicada en el desensamblaje de complejos proteicos necesarios para la formación de adhesiones focales.

Para explicar el efecto inhibitorio de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina en el *spreading* celular analizamos la interacción entre cortactina y la proteína tirosina quinasa FAK. Un estudio previo, en el que había participado la investigadora principal de nuestro grupo, demostró que cortactina fosforilada en residuos de serina y la quinasa FAK son capaces de interaccionar directamente tras la infección por *Helicobacter pylori*, para lo cual es necesario el dominio SH3 de cortactina y el dominio rico en prolinas PRR3 de FAK (Tegtmeyer, Wittelsberger *et al.* 2011). Además, los mutantes individuales miméticos de la fosforilación de cortactina en residuos de serina favorecen la interacción con la quinasa FAK. Mientras que el mutante mimético de cortactina fosforilada en

residuos de tirosina inhibe la interacción con la quinasa FAK tras la infección por *Helicobacter pylori* (Tegtmeyer, Wittelsberger *et al.* 2011). Basándonos en este estudio, establecimos la hipótesis de que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina podría impedir la interacción a través del dominio SH3 con la quinasa FAK durante el *spreading* celular.

El análisis de la interacción de cortactina y la proteína tirosina quinasa FAK revela que el dominio SH3 de cortactina es capaz de interaccionar con la quinasa FAK durante el *spreading* celular (Fig. 27B). Mientras que cortactina fosforilada en residuos de tirosina por la quinasa Src mediante el sistema FIT no parece interaccionar con la quinasa FAK (Fig. 27C).

Por otro lado, la proteína N-WASP que es capaz de interaccionar con cortactina (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004) y con la proteína tirosina quinasa FAK (Wu, Suetsugu *et al.* 2004) no parece ser necesaria para la interacción entre cortactina y la quinasa FAK (Fig. 28).

Un estudio muy similar al nuestro demostró que la interacción entre la quinasa FAK y el mutante mimético de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina disminuye drásticamente en comparación con cortactina WT. Asimismo este trabajo describe que la sobreexpresión del mutante mimético de la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina incrementa la migración celular (Wang, Liu *et al.* 2011), en concordancia con estudios previos (Kruchten, Krueger *et al.* 2008). Por tanto, los datos obtenidos en dicho estudio confirmarían los resultados obtenidos en nuestro estudio en los que se muestra que cortactina fosforilada en residuos de tirosina mediante el sistema FIT no parece interaccionar con la quinasa FAK durante el *spreading* celular (Fig. 27C).

Posteriormente otro estudio expone un modelo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral. En dicho modelo proponen que inicialmente la proteína tirosina quinasa FAK podría unirse a paxilina en las adhesiones focales. La interacción entre cortactina y FAK promovería la estabilización de actina-F en estas estructuras. Además, proponen que cortactina también puede ser fosforilada directamente por la proteína tirosina quinasa FAK. La activación de la quinasa FAK mediada por la señalización de las integrinas promovería la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina, lo cual debilitaría la interacción entre ambas proteínas. Por tanto, la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina desencadenaría la desestabilización de las adhesiones focales, permitiendo la motilidad celular (Tomar, Lawson *et al.* 2012).

Desde el punto de vista clínico, la interacción entre cortactina y la proteína tirosina quinasa FAK presenta una gran relevancia, ya que dicha interacción está implicada en la regulación de la resistencia a la radioterapia del cáncer humano de cabeza y cuello (Eke,

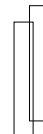
Deuse *et al.* 2012). En el estudio de Eke *et al.* 2012 muestran que la inhibición de la integrina $\beta 1$ promueve la desfosforilación de FAK resultando en la disociación del complejo FAK/cortactina, lo cual favorecería la radiosensibilización de las células tumorales.

En la presente tesis doctoral se ha demostrado que cortactina fosforilada en residuos de tirosina mediante el sistema FIT altera la dinámica del *spreading* celular probablemente al no ser capaz de interaccionar con la proteína tirosina quinasa FAK. Estos resultados indican que cortactina desempeña un papel relevante en la regulación del *spreading* celular, posiblemente afectando a la señalización de las integrinas. En relación a estos resultados, gracias a una estancia de la doctoranda en el Laboratorio del Dr. Christoph Ballestrem (University of Manchester, Reino Unido) se profundizó en el estudio de la dinámica de las adhesiones focales. El objetivo del estudio fue analizar la implicación de los diferentes dominios de unión a vinculina del bastón de talina en la estabilidad de las adhesiones focales.

Por otra parte sería interesante estudiar cómo afecta la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina a su estructura tridimensional. Un estudio estructural ha propuesto que la zona de las repeticiones de cortactina podría tener una conformación globular parcialmente desordenada y altamente dinámica en solución (Shvetsov, Berkane *et al.* 2009). La deacetilación de los residuos de lisina permitiría la interacción de actina-F a la zona de las repeticiones y esto podría provocar la organización de la zona de las repeticiones dando lugar a un cambio conformacional que facilitaría la unión de la proteína tirosina quinasa Src.

Además, varios estudios sugieren que la fosforilación por Erk provoca un *shift* de 80 a 85 kDa detectado mediante análisis por WB, lo cual indicaría un posible cambio en la estructura tridimensional de cortactina que daría lugar a una conformación abierta (Campbell, Sutherland *et al.* 1999; Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004). Asimismo, la fosforilación por la quinasa Erk favorece la interacción de cortactina con otras proteínas a través del dominio SH3, por tanto esta modificación parece inducir un estado activo de la molécula de cortactina (Martinez-Quiles, Ho *et al.* 2004; Tegtmeyer, Wittelsberger *et al.* 2011).

Un estudio en el que se han diseñado anticuerpos específicos que reconocen cortactina fosforilada en residuos de serina indica que la fosforilación por la quinasa Erk no parece ser suficiente para provocar el desplazamiento de la movilidad electroforética de 80 a 85 kDa (Kelley, Hayes *et al.* 2010; Evans, Kelley *et al.* 2011). En dicho estudio sugieren mediante el empleo *in vivo* de mutantes de cortactina no fosforilables en residuos de



serina o de tirosina que la fosforilación de cortactina en residuos de tirosina por la quinasa Src no requiere de la fosforilación en residuos de serina por la quinasa Erk. Sin embargo, no hay suficientes evidencias de que ambas modificaciones puedan ocurrir simultáneamente en la misma molécula de cortactina (Kelley, Hayes *et al.* 2011).

El sistema FIT podría representar una estrategia ideal para comprobar la compatibilidad de la fosforilación en residuos de tirosina y en residuos de serina de cortactina. Asimismo sería interesante comprobar si la fosforilación en residuos de serina es compatible con la acetilación de cortactina para profundizar en la regulación de esta proteína por sus diferentes modificaciones post-traduccionales.

En resumen, la acetilación en residuos de lisina y la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina no ocurren simultáneamente en la misma molécula de cortactina. Estas modificaciones post-traduccionales probablemente provocan cambios conformacionales en cortactina alterando la capacidad de interactuar a través de su dominio SH3 con la proteína tirosina quinasa FAK. Por tanto, estas modificaciones post-traduccionales suponen un mecanismo de regulación de cortactina en procesos como el *spreading* celular.

Las isoformas de la familia Crk se localizan en los pedestales formados por EPEC, interaccionan con la proteína efectora Tir e impiden la localización de Nck en estas estructuras

La familia de proteínas adaptadoras Crk está formada por las isoformas celulares CrkI, CrkII y CrkL. Las proteínas adaptadoras de la familia Crk forman complejos proteicos implicados en la transducción de señales en diversas rutas, participando en la regulación de procesos como adhesión, migración celular y formación de adhesiones focales (revisado en (Bell and Park 2012)). Además, esta familia de proteínas adaptadoras está implicada en la infección por diferentes patógenos (revisado en (Birge, Kalodimos *et al.* 2009)).

La proteína adaptadora CrkII se localiza en los pedestales de actina formados en la célula tras la infección por EPEC (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Además, estudios previos de nuestro grupo indican que en ausencia de todas las isoformas de la familia Crk se produce un aumento significativo en el número de pedestales de actina formados por EPEC. Esto fue demostrado empleando fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Crk*, en los que se inhibió la expresión de CrkL mediante *siRNA* y posteriormente fueron infectados por EPEC (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral).

Sin embargo, la ausencia individual de CrkII mediante la inhibición por *siRNA* en células HeLa o mediante el uso de fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *Crk* no provoca una variación en el número de pedestales, lo cual sugiere que la isoforma CrkII desempeña un papel redundante en la formación del pedestal por EPEC (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral). Por tanto, en la presente tesis doctoral se ha estudiado el posible mecanismo por el cual las proteínas adaptadoras Crk presentan un papel inhibitorio y redundante en la formación de pedestales de actina por EPEC.

En el presente estudio se ha observado que la inhibición individual de CrkL mediante *siRNA* en células HeLa no provoca una variación en el número de pedestales formados por EPEC (Fig. 37). Esto podría deberse a que el porcentaje de inhibición de la expresión de CrkL fue del 53%, por tanto la fracción restante de CrkL no inhibido podría ser suficiente para mantener el número de pedestales formados sin variación con respecto a las células sin inhibir. Para confirmar este resultado sería necesario inhibir la expresión de CrkL mediante *siRNA* empleando otro oligonucleótido de CrkL.

Para descartar que la fracción de CrkL no inhibido estuviera enmascarando el fenotipo, se empleó una línea de fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *CrkL* (Fig. 38). Asimismo, esta línea celular tampoco presenta una variación significativa en el número de pedestales comparado a las células WT. Por tanto, la ausencia de CrkL no

parece ser suficiente para promover el aumento en el número de pedestales tras la infección por EPEC. Además, la sobreexpresión del mutante Myc-CrkII-R38V en los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *CrkL* no provoca una variación significativa en el número de pedestales comparado a las células WT y a las células deficientes en *CrkL* (Fig. 38).

Para explicar la ausencia de efecto en el número de pedestales formados al inhibir la expresión de *CrkL* en presencia de alguna de las isoformas se llevó a cabo un análisis por WB de los niveles de expresión de *CrkL* y *CrkII* en células deficientes en *Crkl/II* o en *CrkL* (Fig. 39A y B). Como resultado del análisis por WB se observó que en los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de alguna de las isoformas de la familia *Crk* se produce un incremento en los niveles de expresión de las isoformas restantes. Esto explicaría que no haya variación en el número de pedestales en los fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* de *CrkL*, ya que la isoforma *CrkII* se estaría sobreexpresando y contrarrestaría la ausencia de *CrkL*.

Hasta el momento no se habían detectado diferencias significativas en los niveles de expresión de las isoformas restantes de la familia *Crk* en ausencia de *Crkl/II* o *CrkL* en comparación a las células WT mediante análisis por WB (Guris, Fantes *et al.* 2001; Park, Boyd *et al.* 2006). Sin embargo, el uso del escáner *Odyssey* ha posibilitado la cuantificación en paralelo de estas diferencias en los niveles de expresión de *CrkII* y *CrkL* con respecto a las células WT, ya que permite la detección de dos anticuerpos primarios de diferente origen de forma simultánea que son reconocidos por dos anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluorocromos.

En concordancia con estos resultados, varios estudios han demostrado que las isoformas de la familia *Crk* podrían tener un papel redundante en determinados contextos (revisado en (Birge, Kalodimos *et al.* 2009)). Además, recientemente un estudio ha analizado la función de las isoformas de la familia *Crk* empleando fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* condicionales de los genes *Crk* y *CrkL*, mediante la técnica de recombinación Cre/loxP. Los fibroblastos doble *knockout* de *Crk* y *CrkL* presentan una reducción de la superficie celular, así como una disminución de la formación de adhesiones focales y de la motilidad celular, entre otras alteraciones. Mientras que la eliminación individual de los genes *Crk* y *CrkL* no produce efectos tan drásticos en la morfología de los fibroblastos. Esto indica que las isoformas de la familia *Crk* presentan funciones solapantes en la estructura y motilidad de los fibroblastos (Park and Curran 2013). Sin embargo, las isoformas *Crkl/II* y *CrkL* parecen tener funciones independientes durante el desarrollo embrionario, ya que los ratones *knockout* del gen *Crk*

o del gen *CrkL* presentan letalidad embrionaria (Guris, Fantes *et al.* 2001; Park, Boyd *et al.* 2006).

Además, en la presente tesis doctoral se ha estudiado la implicación del dominio SH2 de CrkII en su localización en el pedestal de actina formado por EPEC. La isoforma CrkII WT transfectada, usada como control, se localiza en los pedestales (Fig. 30B), al igual que CrkII endógeno (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Por el contrario, CrkL endógeno parece localizarse en el citoplasma y no se observa una acumulación en los pedestales (no mostrado). Esto probablemente se deba a que la especificidad del anticuerpo anti-CrkL empleado para efectuar las IFIs es menor que la del anticuerpo anti-CrkII. Para mejorar la detección de CrkL por inmunofluorescencia se podría haber sobreexpresado esta isoforma mediante transfección.

Para analizar si el dominio SH2 presente en CrkII está implicado en su localización en el pedestal se transfectó el mutante Myc-CrkII-R38V en células HeLa. Este mutante se considera que actúa como un dominante negativo de CrkII (Ota, Kizaka-Kondoh *et al.* 1998), probablemente debido a que compete con Crk endógeno por la unión de sustratos ricos en residuos de prolina principalmente a través del dominio nSH3 (Garcia-Guzman, Larsen *et al.* 2000).

A diferencia de CrkII WT, el mutante Myc-CrkII-R38V se localiza principalmente en el citoplasma (Fig. 30B), lo cual indica que la localización de CrkII en el pedestal de actina requiere de su dominio SH2 funcional. Las IFIs se han analizado como un resultado cualitativo debido a la dificultad de cuantificar las acumulaciones de Myc-CrkII en los pedestales. Estos datos sugieren que la localización de CrkII en el pedestal podría estar mediada por su interacción con proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

Previamente, nuestro grupo había observado que la sobreexpresión de Myc-CrkII o del mutante Myc-CrkII-R38V en células HeLa infectadas por EPEC no produce una variación en el número de pedestales en comparación a las células HeLa sin transfectar (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral). Esto puede deberse a que las células HeLa presentan las tres isoformas de la familia Crk funcionales (CrkI, CrkII y CrkL) (Dokainish, Gavicherla *et al.* 2007), lo cual podría contrarrestar el efecto del mutante Myc-CrkII-R38V.

Además, la transfección del dominio SH2 aislado de CrkII en células HeLa es suficiente para su localización en el pedestal (Fig. 31B), lo cual está en concordancia con los resultados anteriores (Fig. 30).

Por otra parte, el dominio nSH3 de CrkII y de CrkL interacciona con las proteínas tirosina quinasas Abl y Arg (Feller, Knudsen *et al.* 1994; Ren, Ye *et al.* 1994; ten Hoeve,

Kaartinen *et al.* 1994). Estas proteínas tirosina quinasas se localizan en los pedestales de actina formados por EPEC, donde son activadas (Swimm, Bommarius *et al.* 2004). Además, el dominio SH2 presente en CrkII contiene una región de 17 aminoácidos adicionales enriquecida en residuos de prolina. Esta región también es capaz de interactuar con el dominio SH3 de Abl (Donaldson, Gish *et al.* 2002). Por tanto, aunque el dominio SH2 parece ser suficiente para la localización de CrkII en el pedestal, no se puede descartar que otros dominios de Crk, tales como el dominio nSH3 contribuyan a su localización en estas estructuras. Para confirmar la contribución del dominio SH2 de CrkII en su localización en el pedestal sería necesario sobreexpresar CrkII en ausencia de su dominio SH2 y analizar su localización en células infectadas por EPEC.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral indican que la sobreexpresión por transfección del dominio SH2 de CrkII aislado provoca una disminución del número de pedestales con respecto a las células HeLa transfectadas con GFP vacío y a las células sin transfectar usadas como control (Fig. 31 y no mostrado). Este resultado sugiere que las proteínas adaptadoras de la familia Crk tienen un papel inhibitorio en la formación del pedestal de actina, en concordancia con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral).

De forma análoga a CrkII, la sobreexpresión del dominio SH2 aislado de la proteína adaptadora Nck disminuye el número de pedestales formados por EPEC (Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001). La proteína adaptadora Nck se localiza en los pedestales de actina y participa en la principal ruta de polimerización de actina en estas estructuras. La proteína adaptadora Nck es capaz de interactuar a través de su dominio SH2 con el residuo de tirosina 474 fosforilado de la proteína efectora bacteriana Tir (Gruenheid, DeVinney *et al.* 2001). Al mismo tiempo, la proteína adaptadora Nck puede interactuar a través de sus dominios SH3 con la proteína N-WASP, la cual activa al complejo Arp2/3 promoviendo la polimerización de actina (Kalman, Weiner *et al.* 1999; Rohatgi, Nollau *et al.* 2001). La disminución del número de pedestales mediada por el dominio SH2 de Nck probablemente se deba a que este dominio es capaz de interactuar con la proteína efectora Tir, pero no puede unir a la proteína N-WASP. Alternativamente existe una ruta de formación de pedestales de actina independiente de Nck, en la cual están implicados los residuos de tirosina 454 y 474 fosforilados de la proteína efectora Tir (Campellone and Leong 2005).

Además, la sobreexpresión del dominio SH2 de CrkII aislado desplaza a la proteína adaptadora Nck2 del pedestal (Fig. 32). Por tanto, el dominio SH2 de CrkII podría provocar la disminución de pedestales alterando la localización de Nck en estas estructuras. Una

explicación posible a este efecto sería que las proteínas adaptadoras Crk y Nck compitieran por la unión a la misma proteína fosforilada en residuos de tirosina en el pedestal.

Como ha sido demostrado mediante ensayos PD en la presente tesis doctoral, el dominio SH2 de CrkII y de CrkL es capaz de interaccionar con la proteína efectora bacteriana Tir fosforilada en residuos de tirosina (Fig. 40). Además, dicha interacción es dependiente de la fosforilación en el residuo de tirosina 474 de Tir (Fig. 41). Por tanto, el papel inhibitorio de la familia Crk en la formación de pedestales de actina podría deberse a que el dominio SH2 presente en CrkII y CrkL interaccione con el residuo Y474 fosforilado de Tir, lo cual impediría la unión de la proteína adaptadora Nck a dicho residuo, bloqueando la principal ruta de polimerización de actina necesaria para la formación de los pedestales. Para confirmar esto se podría efectuar un ensayo de polimerización de actina con la proteína adaptadora Nck y el péptido de Tir de 12 aminoácidos que contiene el residuo Y474 fosforilado (Campellone, Rankin *et al.* 2004) en presencia o ausencia de las proteínas adaptadoras CrkII y CrkL.

Los resultados obtenidos en este estudio explicarían el hallazgo de Goosney *et al.* 2001, en el cual no se observa una acumulación de la isoforma CrkII en los pedestales formados en células HeLa infectadas con una cepa de EPEC que expresa un mutante de Tir no fosforilable en el residuo de tirosina 474 (Y474F) (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). Sin embargo hay que tener en cuenta que las células infectadas por la cepa de EPEC que expresa el mutante de Tir Y474F presentan una reducción drástica en el número de pedestales formados en comparación con EPEC WT (Campellone and Leong 2005).

La interacción entre el dominio SH2 presente en las proteínas adaptadoras Crk y la proteína efectora Tir parece ser específica, ya que dicho dominio no es capaz de unir al mutante no fosforilable de Tir Y474F. Además, la proteína efectora Tir no es capaz de interaccionar con el dominio SH2 de la proteína adaptadora Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) (Campellone and Leong 2005). Sin embargo, el residuo de tirosina 474 de Tir (⁴⁷⁴YDEV) no cumple con la secuencia consenso de reconocimiento del dominio SH2 presente en CrkII y CrkL (pYXXP/L, donde X puede ser cualquier aminoácido) (Songyang, Shoelson *et al.* 1993; Liu, Jablonowski *et al.* 2010). Esto podría explicarse debido a que la selectividad del reconocimiento de los péptidos fosforilados en residuos de tirosina también está determinada por residuos aminoacídicos permisivos y no permisivos cercanos al motivo consenso (revisado en (Liu, Engelmann *et al.* 2012)). En la bibliografía se han descrito otros ejemplos de proteínas que interaccionan a través de su dominio SH2 con proteínas fosforiladas en residuos de tirosina que carecen del motivo consenso. Este es el caso de cortactina fosforilada en residuos de tirosina (⁴²¹YEDA, ⁴⁶⁶YETT, ⁴⁸²YDGY), que es

capaz de interactuar directamente con el dominio SH2 de Crk durante la invasión por *Shigella* (Bougneres, Girardin *et al.* 2004).

En la presente tesis doctoral también se ha demostrado que la infección por EPEC en células HeLa induce una fosforilación progresiva del residuo de tirosina regulatorio 221 de CrkII y 207 de CrkL con un pico máximo de fosforilación a las 2 horas de infección a una MOI de 45 (Fig. 33C-F). A una MOI de 3 el pico de fosforilación de CrkII y CrkL se retrasa (Fig. 33A y B). Por tanto, la fosforilación de Crk es dependiente de la MOI empleada durante la infección por EPEC.

Las proteínas adaptadoras CrkII y CrkL fosforiladas en el residuo de tirosina regulatorio durante la infección por EPEC se localizan específicamente en una fina capa entre el pedestal y la bacteria, a una MOI de 15 (Fig. 36). Asimismo, mediante IFI se observa que después de 3 horas de infección a una MOI de 15 parece haber una mayor fosforilación en residuos de tirosina de CrkII y CrkL en los pedestales con respecto a 2 horas de infección (Fig. 35). Estos resultados concuerdan con la fosforilación progresiva de CrkII y CrkL observada en el análisis efectuado por WB de las IPs y de los lisados de las células HeLa infectadas por EPEC (Fig. 33).

La fosforilación del residuo de tirosina 221 de CrkII también es inducida durante el *spreading* celular sobre fibronectina (Abassi and Vuori 2002). Además, la fosforilación del residuo 221 de Crk parece ser necesaria para la localización en la membrana de CrkII y de la GTPasa Rac. Asimismo, la mutación Y221F de CrkII mejora la interacción con sus proteínas de unión. Esto probablemente se debe a que dicha mutación bloquea las interacciones intramoleculares autoinhibitorias incrementando la disponibilidad del dominio SH2 de CrkII para interactuar con sustratos fosforilados en residuos de tirosina. Por ello habría sido relevante analizar la localización de los mutantes no fosforilables de CrkII (Y221F) y de CrkL (Y207F). De esta forma se podría comprobar si la fosforilación de los adaptadores Crk en el residuo de tirosina regulatorio es necesaria para su localización en el pedestal.

El residuo de tirosina regulatorio de CrkII y CrkL es fosforilado principalmente por las proteínas tirosina quinasas Abl y Arg (Feller, Knudsen *et al.* 1994; Ren, Ye *et al.* 1994; de Jong, ten Hoeve *et al.* 1997). Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas tirosina quinasas Abl y Arg se localizan en los pedestales de actina formados tras la infección por EPEC (Swimm, Bommarius *et al.* 2004), en concordancia con la localización de las isoformas CrkII y CrkL fosforiladas en el residuo de tirosina regulatorio (Fig. 36). Las proteínas tirosina quinasas Abl y Arg fosforilarían progresivamente el residuo de tirosina regulatorio de Crk en el pedestal, lo cual promovería la interacción con su propio dominio SH2 bloqueando la interacción con el residuo Y474 de la proteína efectora Tir. Por lo que la fosforilación en el

residuo de tirosina regulatorio podría contrarrestar el efecto inhibitorio de las proteínas adaptadoras Crk en la formación de los pedestales.

Además, las quinasas Abl y Arg son activadas en los pedestales de actina donde fosforilan a la proteína efectora bacteriana Tir. Estas quinasas son suficientes para el mantenimiento y formación de los pedestales. Sin embargo, las células derivadas de ratones *knockout* de Abl y Arg son capaces de formar pedestales, debido a que la proteína efectora Tir puede ser fosforilada por otras proteínas tirosina quinasas (Swimm, Bommarius *et al.* 2004; Bommarius, Maxwell *et al.* 2007). Por tanto, sería interesante analizar la contribución de otras proteínas tirosina quinasas en la fosforilación y localización de las proteínas adaptadoras Crk durante la infección por EPEC en células deficientes en las quinasas Abl/Arg. Este podría ser el caso de la quinasa EGFR que es capaz de fosforilar a CrkII en el residuo de tirosina regulatorio y además es activada durante la infección por EPEC (Hashimoto, Katayama *et al.* 1998; Roxas, Koutsouris *et al.* 2007).

Dado que la infección por EPEC induce la fosforilación en el residuo de tirosina regulatorio de CrkII y CrkL (Fig. 33 y 36), lo cual promueve la interacción con su propio dominio SH2 (Jankowski, Saleh *et al.* 2012), cabría esperar que CrkII y CrkL sean incapaces de interactuar con cortactina fosforilada en residuos de tirosina durante la infección por EPEC (Cantarelli, Kodama *et al.* 2007; Nieto-Pelegrin and Martinez-Quiles 2009). En concordancia con esta hipótesis, no se ha detectado interacción entre cortactina y Crk mediante IP (Nieto-Pelegrín 2013, UCM-Tesis doctoral), ni en ensayos PD con proteína recombinante del dominio SH2 de CrkII y de CrkL empleando lisados de células HeLa infectadas por EPEC. Aunque para corroborar estos resultados se podrían realizar ensayos PD con el dominio SH2 de CrkII y de CrkL empleando lisados de células HeLa que sobreexpresen cortactina por transfección y sean posteriormente infectadas por EPEC.

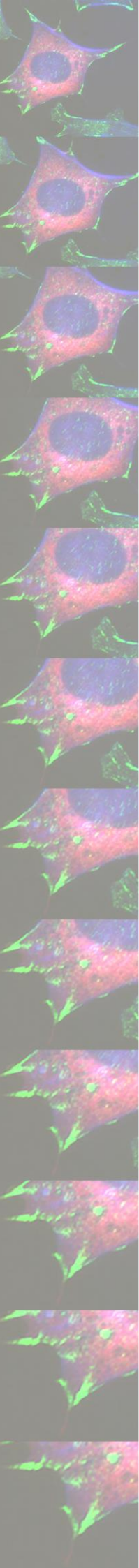
Por el contrario, durante la infección por *Shigella flexneri*, el dominio SH2 de Crk parece interactuar con cortactina fosforilada en residuos de tirosina lo cual favorece la invasión de la bacteria (Bougneres, Girardin *et al.* 2004). Esto parece indicar que Crk podría regular positiva o negativamente la polimerización de actina en diferentes rutas activadas durante la infección por distintos patógenos.

La inhibición de la formación de pedestales de actina mediada por las proteínas adaptadoras Crk propuesta en la tesis de Elvira Nieto Pelegrín y caracterizada en la presente tesis doctoral, no debería tener repercusión en la infección por el patógeno EHEC. EHEC al igual que EPEC forma parte del grupo de patógenos A/E que forman pedestales de actina desde una posición extracelular. Sin embargo, Crk no se localiza en los pedestales formados por EHEC (Goosney, DeVinney *et al.* 2001). A diferencia de Tir_{EPEC}, Tir_{EHEC} no

presenta el residuo Y474. Además, en los pedestales formados por EHEC no se acumulan proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y la polimerización de actina no está mediada por Nck (revisado en (Lai, Rosenshine *et al.* 2013)).

En la presente tesis doctoral se ha demostrado que la sobreexpresión del dominio SH2 de CrkII inhibe la formación de pedestales, así como la localización de Nck en el pedestal. Esto probablemente ocurre debido a que el dominio SH2 presente en CrkII y CrkL es capaz de interaccionar con la proteína efectora Tir a través del residuo de tirosina 474 fosforilado, bloqueando la principal ruta de polimerización de actina necesaria para la formación del pedestal, Tir-Nck-N-WASP. Por otra parte, se ha observado que la eliminación de la isoforma CrkL no altera el número de pedestales durante la infección por EPEC, esto podría deberse a que en ausencia de alguna de las isoformas de la familia Crk se sobreexpresan las isoformas restantes. Asimismo, la infección por EPEC induce la fosforilación del residuo de tirosina regulatorio de las proteínas adaptadoras CrkII y CrkL, lo cual podría ser un mecanismo que bloquea la interacción de Crk con la proteína efectora bacteriana Tir.

CONCLUSIONS





CONCLUSIONS

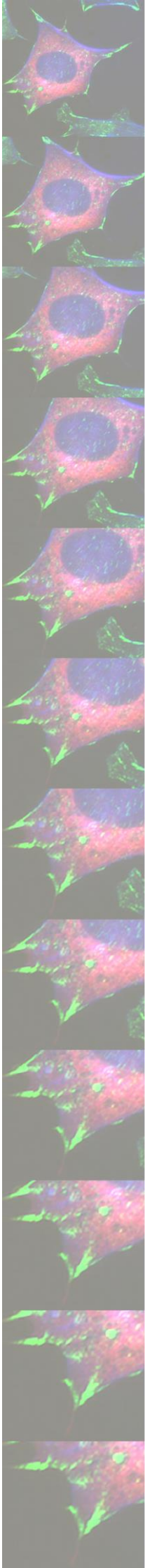
Part I: Study the tyrosine phosphorylation of cortactin and its effect in cell spreading.

1. The Functional Interaction Trap system promotes an efficient and specific tyrosine phosphorylation of cortactin by Src kinase.
2. Tyrosine phosphorylated cortactin is not simultaneously found acetylated.
3. Cortactin promotes cell spreading whilst tyrosine phosphorylated cortactin inhibits cell spreading, in part due to the disruption of the cortactin-FAK complex.

Part II: Study the redundant inhibitory role of Crk family adaptor proteins in pedestal formation by EPEC.

1. The SH2 domain of CrkII is sufficient for its localisation at pedestals. CrkII and CrkL are able to interact through their SH2 domain with the tyrosine phosphorylated effector Tir and the phosphorylation of the tyrosine 474 of Tir is crucial in order to allow this interaction.
2. The previously found inhibitory role of Crk adaptor proteins in pedestal formation is in part due to the blocking exerted by their SH2 domain over the recruitment of Nck adaptor protein to pedestals.
3. EPEC infection promotes the phosphorylation of the regulatory tyrosine residue of CrkII and CrkL at pedestals.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- Abassi Y.A. and Vuori K. (2002). "Tyrosine 221 in Crk regulates adhesion-dependent membrane localization of Crk and Rac and activation of Rac signaling." *EMBO J* 21(17): 4571-4582.
- Ammer A.G. and Weed S.A. (2008). "Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics." *Cell Motil Cytoskeleton* 65(9): 687-707.
- Anafi M., Rosen M.K., Gish G.D., Kay L.E. and Pawson T. (1996). "A potential SH3 domain-binding site in the Crk SH2 domain." *J Biol Chem* 271(35): 21365-21374.
- Arkinstall S., Payton M. and Maundrell K. (1995). "Activation of phospholipase C gamma in *Schizosaccharomyces pombe* by coexpression of receptor or nonreceptor tyrosine kinases." *Mol Cell Biol* 15(3): 1431-1438.
- Arndt K.M., Pelletier J.N., Muller K.M., Alber T., Michnick S.W. and Pluckthun A. (2000). "A heterodimeric coiled-coil peptide pair selected in vivo from a designed library-versus-library ensemble." *J Mol Biol* 295(3): 627-639.
- Arnold R., Jehl A. and Rattei T. (2010). "Targeting effectors: the molecular recognition of Type III secreted proteins." *Microbes Infect* 12(5): 346-358.
- Ayala I., Baldassarre M., Giacchetti G., Caldieri G., Tete S., Luini A. and Buccione R. (2008). "Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation." *J Cell Sci* 121(Pt 3): 369-378.
- Bass M.D., Patel B., Barsukov I.G., Fillingham I.J., Mason R., Smith B.J., Bagshaw C.R. and Critchley D.R. (2002). "Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin." *Biochem J* 362(Pt 3): 761-768.
- Bell E.S. and Park M. (2012). "Models of crk adaptor proteins in cancer." *Genes Cancer* 3(5-6): 341-352.
- Bhavsar A.P., Guttman J.A. and Finlay B.B. (2007). "Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens." *Nature* 449(7164): 827-834.
- Biosse Duplan M., Zalli D., Stephens S., Zenger S., Neff L., Oelkers J.M., Lai F.P., Horne W., Rottner K. and Baron R. (2014). "Microtubule dynamic instability controls podosome patterning in osteoclasts through EB1, cortactin, and Src." *Mol Cell Biol* 34(1): 16-29.
- Birge R.B., Kalodimos C., Inagaki F. and Tanaka S. (2009). "Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling." *Cell Commun Signal* 7: 13.
- Bladt F., Aippersbach E., Gelkop S., Strasser G.A., Nash P., Tafuri A., Gertler F.B. and Pawson T. (2003). "The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network." *Mol Cell Biol* 23(13): 4586-4597.
- Boggon T.J. and Eck M.J. (2004). "Structure and regulation of Src family kinases." *Oncogene* 23(48): 7918-7927.
- Bommarius B., Maxwell D., Swimm A., Leung S., Corbett A., Bornmann W. and Kalman D. (2007). "Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir is an SH2/3 ligand that recruits and activates tyrosine kinases required for pedestal formation." *Mol Microbiol* 63(6): 1748-1768.

- Bougnères L., Girardin S.E., Weed S.A., Karginov A.V., Olivo-Marin J.C., Parsons J.T., Sansonetti P.J. and Van Nhieu G.T. (2004). "Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells." *J Cell Biol* 166(2): 225-235.
- Boyle E.C., Brown N.F., Brumell J.H. and Finlay B.B. (2007). "Src homology domain 2 adaptors affect adherence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to non-phagocytic cells." *Microbiology* 153(Pt 10): 3517-3526.
- Boyle S.N., Michaud G.A., Schweitzer B., Predki P.F. and Koleske A.J. (2007). "A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation." *Curr Biol* 17(5): 445-451.
- Bryce N.S., Clark E.S., Leysath J.L., Currie J.D., Webb D.J. and Weaver A.M. (2005). "Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence." *Curr Biol* 15(14): 1276-1285.
- Buday L., Wunderlich L. and Tamas P. (2002). "The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton." *Cell Signal* 14(9): 723-731.
- Burianek L.E. and Soderling S.H. (2013). "Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes." *Semin Cell Dev Biol* 24(4): 258-266.
- Burridge K. and Mangeat P. (1984). "An interaction between vinculin and talin." *Nature* 308(5961): 744-746.
- Calalb M.B., Polte T.R. and Hanks S.K. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." *Mol Cell Biol* 15(2): 954-963.
- Calderwood D.A., Campbell I.D. and Critchley D.R. (2013). "Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8): 503-517.
- Calderwood D.A., Yan B., de Pereda J.M., Alvarez B.G., Fujioka Y., Liddington R.C. and Ginsberg M.H. (2002). "The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins." *J Biol Chem* 277(24): 21749-21758.
- Calderwood D.A., Zent R., Grant R., Rees D.J., Hynes R.O. and Ginsberg M.H. (1999). "The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation." *J Biol Chem* 274(40): 28071-28074.
- Campbell D.H., Sutherland R.L. and Daly R.J. (1999). "Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin." *Cancer Res* 59(20): 5376-5385.
- Campellone K.G., Brady M.J., Alamares J.G., Rowe D.C., Skehan B.M., Tipper D.J. and Leong J.M. (2006). "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Tir requires a C-terminal 12-residue peptide to initiate EspF-mediated actin assembly and harbours N-terminal sequences that influence pedestal length." *Cell Microbiol* 8(9): 1488-1503.
- Campellone K.G., Giese A., Tipper D.J. and Leong J.M. (2002). "A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals." *Mol Microbiol* 43(5): 1227-1241.

- Campellone K.G. and Leong J.M. (2005). "Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir." *Mol Microbiol* 56(2): 416-432.
- Campellone K.G., Rankin S., Pawson T., Kirschner M.W., Tipper D.J. and Leong J.M. (2004). "Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly." *J Cell Biol* 164(3): 407-416.
- Campellone K.G. and Welch M.D. (2010). "A nucleator arms race: cellular control of actin assembly." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4): 237-251.
- Cantarelli V.V., Kodama T., Nijstad N., Abolghait S.K., Nada S., Okada M., Iida T. and Honda T. (2007). "Tyrosine phosphorylation controls cortactin binding to two enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effectors: Tir and EspFu/TccP." *Cell Microbiol* 9(7): 1782-1795.
- Cantarelli V.V., Takahashi A., Akeda Y., Nagayama K. and Honda T. (2000). "Interaction of enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli* with HeLa cells results in translocation of cortactin to the bacterial adherence site." *Infect Immun* 68(1): 382-386.
- Cantarelli V.V., Takahashi A., Yanagihara I., Akeda Y., Imura K., Kodama T., Kono G., Sato Y., Iida T. and Honda T. (2002). "Cortactin is necessary for F-actin accumulation in pedestal structures induced by enteropathogenic *Escherichia coli* infection." *Infect Immun* 70(4): 2206-2209.
- Carisey A. and Ballestrem C. (2011). "Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling." *Eur J Cell Biol* 90(2-3): 157-163.
- Carisey A., Tsang R., Greiner A.M., Nijenhuis N., Heath N., Nazgiewicz A., Kemkemer R., Derby B., Spatz J. and Ballestrem C. (2013). "Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner." *Curr Biol* 23(4): 271-281.
- Carlier M.F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G.X., Hong Y., Chua N.H. and Pantaloni D. (1997). "Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility." *J Cell Biol* 136(6): 1307-1322.
- Caron C., Boyault C. and Khochbin S. (2005). "Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability." *Bioessays* 27(4): 408-415.
- Cary L.A., Klinghoffer R.A., Sachsenmaier C. and Cooper J.A. (2002). "SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading." *Mol Cell Biol* 22(8): 2427-2440.
- Castro-Castro A., Janke C., Montagnac G., Paul-Gilloteaux P. and Chavrier P. (2012). "ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion." *Eur J Cell Biol* 91(11-12): 950-960.
- Catarino T., Ribeiro L., Santos S.D. and Carvalho A.L. (2013). "Regulation of synapse composition by protein acetylation: the role of acetylated cortactin." *J Cell Sci* 126(Pt 1): 149-162.

- Cilloni D. and Saglio G. (2012). "Molecular pathways: BCR-ABL." *Clin Cancer Res* 18(4): 930-937.
- Clark E.S., Whigham A.S., Yarbrough W.G. and Weaver A.M. (2007). "Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia." *Cancer Res* 67(9): 4227-4235.
- Clements A., Young J.C., Constantinou N. and Frankel G. (2012). "Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*." *Gut Microbes* 3(2): 71-87.
- Cluzel C., Saltel F., Lussi J., Paulhe F., Imhof B.A. and Wehrle-Haller B. (2005). "The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells." *J Cell Biol* 171(2): 383-392.
- Colicelli J. (2010). "ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity." *Sci Signal* 3(139): re6.
- Cowieson N.P., King G., Cookson D., Ross I., Huber T., Hume D.A., Kobe B. and Martin J.L. (2008). "Cortactin adopts a globular conformation and bundles actin into sheets." *J Biol Chem* 283(23): 16187-16193.
- Crepin V.F., Girard F., Schuller S., Phillips A.D., Mousnier A. and Frankel G. (2010). "Dissecting the role of the Tir:Nck and Tir:IRTKS/IRSp53 signalling pathways *in vivo*." *Mol Microbiol* 75(2): 308-323.
- Chen H.C., Appeddu P.A., Parsons J.T., Hildebrand J.D., Schaller M.D. and Guan J.L. (1995). "Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin." *J Biol Chem* 270(28): 16995-16999.
- Chen L., Ai X., Portaliou A.G., Minetti C.A., Remeta D.P., Economou A. and Kalodimos C.G. (2013). "Substrate-activated conformational switch on chaperones encodes a targeting signal in type III secretion." *Cell Rep* 3(3): 709-715.
- Chen Y.S., Bastidas R.J., Saka H.A., Carpenter V.K., Richards K.L., Plano G.V. and Valdivia R.H. (2014). "The *Chlamydia trachomatis* type III secretion chaperone Slc1 engages multiple early effectors, including TepP, a tyrosine-phosphorylated protein required for the recruitment of CrkI-II to nascent inclusions and innate immune signaling." *PLoS Pathog* 10(2): e1003954.
- Choudhary C., Kumar C., Gnad F., Nielsen M.L., Rehman M., Walther T.C., Olsen J.V. and Mann M. (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." *Science* 325(5942): 834-840.
- de Jong R., ten Hoeve J., Heisterkamp N. and Groffen J. (1997). "Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site." *Oncogene* 14(5): 507-513.
- De Kimpe L., Janssens K., Derua R., Armacki M., Goicoechea S., Otey C., Waelkens E., Vandoninck S., Vandenheede J.R., Seufferlein T. and Van Lint J. (2009). "Characterization of cortactin as an *in vivo* protein kinase D substrate: interdependence of sites and potentiation by Src." *Cell Signal* 21(2): 253-263.
- Dean P. and Kenny B. (2009). "The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell." *Curr Opin Microbiol* 12(1): 101-109.

- del Rio A., Perez-Jimenez R., Liu R., Roca-Cusachs P., Fernandez J.M. and Sheetz M.P. (2009). "Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding." *Science* 323(5914): 638-641.
- Deng Q., Sun J. and Barbieri J.T. (2005). "Uncoupling Crk signal transduction by *Pseudomonas* exoenzyme T." *J Biol Chem* 280(43): 35953-35960.
- Deng W., Vallance B.A., Li Y., Puente J.L. and Finlay B.B. (2003). "*Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice." *Mol Microbiol* 48(1): 95-115.
- Derry J.M., Ochs H.D. and Francke U. (1994). "Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome." *Cell* 79(5): following 922.
- Dokainish H., Gavicherla B., Shen Y. and Ireton K. (2007). "The carboxyl-terminal SH3 domain of the mammalian adaptor CrkII promotes internalization of *Listeria monocytogenes* through activation of host phosphoinositide 3-kinase." *Cell Microbiol* 9(10): 2497-2516.
- Donaldson L.W., Gish G., Pawson T., Kay L.E. and Forman-Kay J.D. (2002). "Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14053-14058.
- Donnenberg M.S., Tacket C.O., James S.P., Losonsky G., Nataro J.P., Wasserman S.S., Kaper J.B. and Levine M.M. (1993). "Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection." *J Clin Invest* 92(3): 1412-1417.
- Eke I., Deuse Y., Hehlhans S., Gurtner K., Krause M., Baumann M., Shevchenko A., Sandfort V. and Cordes N. (2012). "beta(1)Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy." *J Clin Invest* 122(4): 1529-1540.
- Engen J.R., Wales T.E., Hochrein J.M., Meyn M.A., 3rd, Banu Ozkan S., Bahar I. and Smithgall T.E. (2008). "Structure and dynamic regulation of Src-family kinases." *Cell Mol Life Sci* 65(19): 3058-3073.
- Evans J.V., Kelley L.C., Hayes K.E., Ammer A.G., Martin K.H. and Weed S.A. (2011). "Further insights into cortactin conformational regulation." *Bioarchitecture* 1(1): 21-23.
- Feller S.M., Knudsen B. and Hanafusa H. (1994). "c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk." *Embo J* 13(10): 2341-2351.
- Finlay B.B., Rosenshine I., Donnenberg M.S. and Kaper J.B. (1992). "Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells." *Infect Immun* 60(6): 2541-2543.
- Fioretos T., Heisterkamp N., Groffen J., Benjes S. and Morris C. (1993). "CRK proto-oncogene maps to human chromosome band 17p13." *Oncogene* 8(10): 2853-2855.
- Gao Y.S., Hubbert C.C., Lu J., Lee Y.S., Lee J.Y. and Yao T.P. (2007). "Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis." *Mol Cell Biol* 27(24): 8637-8647.

- Garai P., Gnanadhas D.P. and Chakravortty D. (2012). "*Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions." *Virulence* 3(4): 377-388.
- Garcia-Guzman M., Larsen E. and Vuori K. (2000). "The proto-oncogene *c-Cbl* is a positive regulator of Met-induced MAP kinase activation: a role for the adaptor protein Crk." *Oncogene* 19(35): 4058-4065.
- Gardel M.L., Schneider I.C., Aratyn-Schaus Y. and Waterman C.M. (2010). "Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration." *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 315-333.
- Garrity-Ryan L., Kazmierczak B., Kowal R., Comolli J., Hauser A. and Engel J.N. (2000). "The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages." *Infect Immun* 68(12): 7100-7113.
- Geiger B. (1979). "A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells." *Cell* 18(1): 193-205.
- Geiger B., Bershadsky A., Pankov R. and Yamada K.M. (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(11): 793-805.
- Gingras A.R., Ziegler W.H., Bobkov A.A., Joyce M.G., Fasci D., Himmel M., Rothmund S., Ritter A., Grossmann J.G., Patel B., Bate N., Goult B.T., Emsley J., Barsukov I.L., Roberts G.C., Liddington R.C., Ginsberg M.H. and Critchley D.R. (2009). "Structural determinants of integrin binding to the talin rod." *J Biol Chem* 284(13): 8866-8876.
- Goosney D.L., DeVinney R. and Finlay B.B. (2001). "Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals." *Infect Immun* 69(5): 3315-3322.
- Goult B.T., Zacharchenko T., Bate N., Tsang R., Hey F., Gingras A.R., Elliott P.R., Roberts G.C., Ballestrem C., Critchley D.R. and Barsukov I.L. (2013). "RIAM and vinculin binding to talin are mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover." *J Biol Chem* 288(12): 8238-8249.
- Grassart A., Meas-Yedid V., Dufour A., Olivo-Marin J.C., Dautry-Varsat A. and Sauvonnnet N. (2010). "Pak1 phosphorylation enhances cortactin-N-WASP interaction in clathrin-caveolin-independent endocytosis." *Traffic* 11(8): 1079-1091.
- Gregorette I.V., Lee Y.M. and Goodson H.V. (2004). "Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis." *J Mol Biol* 338(1): 17-31.
- Grinnell F. (1978). "Cellular adhesiveness and extracellular substrata." *Int Rev Cytol* 53: 65-144.
- Grinnell F. and Feld M.K. (1979). "Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium: possible role of secreted fibronectin." *Cell* 17(1): 117-129.
- Gruenheid S., DeVinney R., Bladt F., Goosney D., Gelkop S., Gish G.D., Pawson T. and Finlay B.B. (2001). "Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells." *Nat Cell Biol* 3(9): 856-859.

- Guris D.L., Fantes J., Tara D., Druker B.J. and Imamoto A. (2001). "Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene *CRKL* phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome." *Nat Genet* 27(3): 293-298.
- Haglund C.M. and Welch M.D. (2011). "Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton." *J Cell Biol* 195(1): 7-17.
- Hanke J.H., Gardner J.P., Dow R.L., Changelian P.S., Brissette W.H., Weringer E.J., Pollok B.A. and Connelly P.A. (1996). "Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation." *J Biol Chem* 271(2): 695-701.
- Hashimoto Y., Katayama H., Kiyokawa E., Ota S., Kurata T., Gotoh N., Otsuka N., Shibata M. and Matsuda M. (1998). "Phosphorylation of Crkl adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem* 273(27): 17186-17191.
- Hayward R.D., Leong J.M., Koronakis V. and Campellone K.G. (2006). "Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling." *Nat Rev Microbiol* 4(5): 358-370.
- Head J.A., Jiang D., Li M., Zorn L.J., Schaefer E.M., Parsons J.T. and Weed S.A. (2003). "Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton." *Mol Biol Cell* 14(8): 3216-3229.
- Hemmings L., Rees D.J., Ohanian V., Bolton S.J., Gilmore A.P., Patel B., Priddle H., Trevithick J.E., Hynes R.O. and Critchley D.R. (1996). "Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site." *J Cell Sci* 109 (Pt 11): 2715-2726.
- Higgins L.M., Frankel G., Connerton I., Goncalves N.S., Dougan G. and MacDonald T.T. (1999). "Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation." *Science* 285(5427): 588-591.
- Higgs H.N. and Pollard T.D. (2001). "Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins." *Annu Rev Biochem* 70: 649-676.
- Hildebrand J.D., Schaller M.D. and Parsons J.T. (1993). "Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions." *J Cell Biol* 123(4): 993-1005.
- Hoshino D., Branch K.M. and Weaver A.M. (2013). "Signaling inputs to invadopodia and podosomes." *J Cell Sci* 126(Pt 14): 2979-2989.
- Huang C., Liu J., Haudenschild C.C. and Zhan X. (1998). "The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells." *J Biol Chem* 273(40): 25770-25776.
- Huang C., Ni Y., Wang T., Gao Y., Haudenschild C.C. and Zhan X. (1997). "Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* 272(21): 13911-13915.
- Huang C., Tandon N.N., Greco N.J., Ni Y., Wang T. and Zhan X. (1997). "Proteolysis of platelet cortactin by calpain." *J Biol Chem* 272(31): 19248-19252.

- Huang J., Asawa T., Takato T. and Sakai R. (2003). "Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma." *J Biol Chem* 278(48): 48367-48376.
- Humphries J.D., Wang P., Streuli C., Geiger B., Humphries M.J. and Ballestrem C. (2007). "Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin." *J Cell Biol* 179(5): 1043-1057.
- Humphries R.M. and Armstrong G.D. (2010). "Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium." *Future Microbiol* 5(11): 1645-1661.
- Huttelmaier S., Bubeck P., Rudiger M. and Jockusch B.M. (1997). "Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin." *Eur J Biochem* 247(3): 1136-1142.
- Huttenlocher A. and Horwitz A.R. (2011). "Integrins in cell migration." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(9): a005074.
- Ichetovkin I., Grant W. and Condeelis J. (2002). "Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex." *Curr Biol* 12(1): 79-84.
- Iguchi A., Thomson N.R., Ogura Y., Saunders D., Ooka T., Henderson I.R., Harris D., Asadulghani M., Kurokawa K., Dean P., Kenny B., Quail M.A., Thurston S., Dougan G., Hayashi T., Parkhill J. and Frankel G. (2009). "Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69." *J Bacteriol* 191(1): 347-354.
- Illes A., Enyedi B., Tamas P., Balazs A., Bogel G., Melinda, Lukacs and Buday L. (2006). "Cortactin is required for integrin-mediated cell spreading." *Immunol Lett* 104(1-2): 124-130.
- Ingle E. (2008). "Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways." *Biochim Biophys Acta* 1784(1): 56-65.
- Iwahara T., Akagi T., Fujitsuka Y. and Hanafusa H. (2004). "CrkII regulates focal adhesion kinase activation by making a complex with Crk-associated substrate, p130Cas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(51): 17693-17698.
- Iwahara T., Akagi T., Shishido T. and Hanafusa H. (2003). "CrkII induces serum response factor activation and cellular transformation through its function in Rho activation." *Oncogene* 22(38): 5946-5957.
- Jankowski W., Saleh T., Pai M.T., Sriram G., Birge R.B. and Kalodimos C.G. (2012). "Domain organization differences explain Bcr-Abl's preference for CrkL over CrkII." *Nat Chem Biol* 8(6): 590-596.
- Jarvis K.G., Giron J.A., Jerse A.E., McDaniel T.K., Donnenberg M.S. and Kaper J.B. (1995). "Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7996-8000.
- Jerse A.E., Yu J., Tall B.D. and Kaper J.B. (1990). "A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20): 7839-7843.

- Jia L., Uekita T. and Sakai R. (2008). "Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility." *Mol Cancer Res* 6(4): 654-662.
- Johnson R.P. and Craig S.W. (1994). "An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding." *J Biol Chem* 269(17): 12611-12619.
- Kadota S., Fantus I.G., Deragon G., Guyda H.J., Hersh B. and Posner B.I. (1987). "Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase." *Biochem Biophys Res Commun* 147(1): 259-266.
- Kalman D., Weiner O.D., Goosney D.L., Sedat J.W., Finlay B.B., Abo A. and Bishop J.M. (1999). "Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals." *Nat Cell Biol* 1(6): 389-391.
- Kaluza D., Kroll J., Gesierich S., Yao T.P., Boon R.A., Hergenreider E., Tjwa M., Rossig L., Seto E., Augustin H.G., Zeiher A.M., Dimmeler S. and Urbich C. (2011). "Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin." *EMBO J* 30(20): 4142-4156.
- Kaplan K.B., Swedlow J.R., Morgan D.O. and Varmus H.E. (1995). "c-Src enhances the spreading of src-/- fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism." *Genes Dev* 9(12): 1505-1517.
- Karginov A.V., Tsygankov D., Berginski M., Chu P.H., Trudeau E.D., Yi J.J., Gomez S., Elston T.C. and Hahn K.M. (2014). "Dissecting motility signaling through activation of specific Src-effector complexes." *Nat Chem Biol* 10(4): 286-290.
- Kelley L.C., Ammer A.G., Hayes K.E., Martin K.H., Machida K., Jia L., Mayer B.J. and Weed S.A. (2010). "Oncogenic Src requires a wild-type counterpart to regulate invadopodia maturation." *J Cell Sci* 123(Pt 22): 3923-3932.
- Kelley L.C., Hayes K.E., Ammer A.G., Martin K.H. and Weed S.A. (2010). "Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence." *PLoS One* 5(11): e13847.
- Kelley L.C., Hayes K.E., Ammer A.G., Martin K.H. and Weed S.A. (2011). "Revisiting the ERK/Src cortactin switch." *Commun Integr Biol* 4(2): 205-207.
- Kelley L.C. and Weed S.A. (2012). "Cortactin is a substrate of activated Cdc42-associated kinase 1 (ACK1) during ligand-induced epidermal growth factor receptor downregulation." *PLoS One* 7(8): e44363.
- Kenny B. (1999). "Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications." *Mol Microbiol* 31(4): 1229-1241.
- Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D.J., Frey E.A. and Finlay B.B. (1997). "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells." *Cell* 91(4): 511-520.
- Kenny B. and Warawa J. (2001). "Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms." *Infect Immun* 69(3): 1444-1453.

- Kim A.S., Kakalis L.T., Abdul-Manan N., Liu G.A. and Rosen M.K. (2000). "Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein." *Nature* 404(6774): 151-158.
- Kim S.C., Sprung R., Chen Y., Xu Y., Ball H., Pei J., Cheng T., Kho Y., Xiao H., Xiao L., Grishin N.V., White M., Yang X.J. and Zhao Y. (2006). "Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey." *Mol Cell* 23(4): 607-618.
- Kirkbride K.C., Sung B.H., Sinha S. and Weaver A.M. (2011). "Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness." *Cell Adh Migr* 5(2): 187-198.
- Kiyokawa E., Hashimoto Y., Kurata T., Sugimura H. and Matsuda M. (1998). "Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex." *J Biol Chem* 273(38): 24479-24484.
- Klinghoffer R.A., Sachsenmaier C., Cooper J.A. and Soriano P. (1999). "Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction." *EMBO J* 18(9): 2459-2471.
- Knudsen B.S., Feller S.M. and Hanafusa H. (1994). "Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk." *J Biol Chem* 269(52): 32781-32787.
- Knutton S., Baldwin T., Williams P.H. and McNeish A.S. (1989). "Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Infect Immun* 57(4): 1290-1298.
- Kobashigawa Y. and Inagaki F. (2012). "Structural biology: CrkL is not Crk-like." *Nat Chem Biol* 8(6): 504-505.
- Kobashigawa Y., Sakai M., Naito M., Yokochi M., Kumeta H., Makino Y., Ogura K., Tanaka S. and Inagaki F. (2007). "Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK." *Nat Struct Mol Biol* 14(6): 503-510.
- Kruchten A.E., Krueger E.W., Wang Y. and McNiven M.A. (2008). "Distinct phospho-forms of cortactin differentially regulate actin polymerization and focal adhesions." *Am J Physiol Cell Physiol* 295(5): C1113-1122.
- Lafuente E.M., van Puijenbroek A.A., Krause M., Carman C.V., Freeman G.J., Berezovskaya A., Constantine E., Springer T.A., Gertler F.B. and Boussiotis V.A. (2004). "RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion." *Dev Cell* 7(4): 585-595.
- Lai Y., Rosenshine I., Leong J.M. and Frankel G. (2013). "Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*." *Cell Microbiol* 15(11): 1796-1808.
- Lapetina S., Mader C.C., Machida K., Mayer B.J. and Koleske A.J. (2009). "Arg interacts with cortactin to promote adhesion-dependent cell edge protrusion." *J Cell Biol* 185(3): 503-519.
- Lawson C., Lim S.T., Uryu S., Chen X.L., Calderwood D.A. and Schlaepfer D.D. (2012). "FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility." *J Cell Biol* 196(2): 223-232.

- Lee H.S., Lim C.J., Puzon-McLaughlin W., Shattil S.J. and Ginsberg M.H. (2009). "RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences." *J Biol Chem* 284(8): 5119-5127.
- Leipe D.D. and Landsman D. (1997). "Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily." *Nucleic Acids Res* 25(18): 3693-3697.
- Levine M.M., Bergquist E.J., Nalin D.R., Waterman D.H., Hornick R.B., Young C.R. and Sotman S. (1978). "*Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive." *Lancet* 1(8074): 1119-1122.
- Li J., Chen S., Cleary R.A., Wang R., Gannon O.J., Seto E. and Tang D.D. (2014). "Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues." *Am J Physiol Cell Physiol* 307(3): C288-295.
- Li L., Okura M. and Imamoto A. (2002). "Focal adhesions require catalytic activity of Src family kinases to mediate integrin-matrix adhesion." *Mol Cell Biol* 22(4): 1203-1217.
- Linder S., Wiesner C. and Himmel M. (2011). "Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion." *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 185-211.
- Liu B.A., Engelmann B.W. and Nash P.D. (2012). "The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction." *FEBS Lett* 586(17): 2597-2605.
- Liu B.A., Jablonowski K., Shah E.E., Engelmann B.W., Jones R.B. and Nash P.D. (2010). "SH2 domains recognize contextual peptide sequence information to determine selectivity." *Mol Cell Proteomics* 9(11): 2391-2404.
- Liu D. (2014). "The adaptor protein Crk in immune response." *Immunol Cell Biol* 92(1): 80-89.
- Lommel S., Benesch S., Rottner K., Franz T., Wehland J. and Kuhn R. (2001). "Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells." *EMBO Rep* 2(9): 850-857.
- Loosli Y., Luginbuehl R. and Snedeker J.G. (2010). "Cytoskeleton reorganization of spreading cells on micro-patterned islands: a functional model." *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 368(1920): 2629-2652.
- Lua B.L. and Low B.C. (2005). "Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control." *FEBS Lett* 579(3): 577-585.
- Luo Y., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Creagh A.L., Knoechel D.G., Haynes C.A., Finlay B.B. and Strynadka N.C. (2000). "Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex." *Nature* 405(6790): 1073-1077.
- Ly K.T. and Casanova J.E. (2009). "Abelson tyrosine kinase facilitates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium entry into epithelial cells." *Infect Immun* 77(1): 60-69.
- Maa M.C., Wilson L.K., Moyers J.S., Vines R.R., Parsons J.T. and Parsons S.J. (1992). "Identification and characterization of a cytoskeleton-associated, epidermal growth factor sensitive pp60c-src substrate." *Oncogene* 7(12): 2429-2438.
- Martin G.S. (2004). "The road to Src." *Oncogene* 23(48): 7910-7917.

- Martin K.H., Jeffery E.D., Grigera P.R., Shabanowitz J., Hunt D.F. and Parsons J.T. (2006). "Cortactin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry." *J Cell Sci* 119(Pt 14): 2851-2853.
- Martinez-Quiles N. (2013) "Emerging roles of hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in the immune system." *OA Immunology* 2013 Apr 01;1(1):2.
- Martinez-Quiles N., Feuerbacher L.A., Benito-Leon M. and Hardwidge P.R. (2014). "Contribution of Crk Adaptor Proteins to Host Cell and Bacteria Interactions." *BioMed Research International* 2014: 13.
- Martinez-Quiles N., Ho H.Y., Kirschner M.W., Ramesh N. and Geha R.S. (2004). "Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP." *Mol Cell Biol* 24(12): 5269-5280.
- Martinez-Quiles N., Rohatgi R., Anton I.M., Medina M., Saville S.P., Miki H., Yamaguchi H., Takenawa T., Hartwig J.H., Geha R.S. and Ramesh N. (2001). "WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation." *Nat Cell Biol* 3(5): 484-491.
- Maruyama S., Kurosaki T., Sada K., Yamanashi Y., Yamamoto T. and Yamamura H. (1996). "Physical and functional association of cortactin with Syk in human leukemic cell line K562." *J Biol Chem* 271(12): 6631-6635.
- Matsuda M., Hashimoto Y., Muroya K., Hasegawa H., Kurata T., Tanaka S., Nakamura S. and Hattori S. (1994). "CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells." *Mol Cell Biol* 14(8): 5495-5500.
- Matsuda M. and Kurata T. (1996). "Emerging components of the *Crk* oncogene product: the first identified adaptor protein." *Cell Signal* 8(5): 335-340.
- Matsuda M., Tanaka S., Nagata S., Kojima A., Kurata T. and Shibuya M. (1992). "Two species of human *CRK* cDNA encode proteins with distinct biological activities." *Mol Cell Biol* 12(8): 3482-3489.
- Mayer B.J., Hamaguchi M. and Hanafusa H. (1988a). "Characterization of p47gag-crk, a novel oncogene product with sequence similarity to a putative modulatory domain of protein-tyrosine kinases and phospholipase C." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2: 907-914.
- Mayer B.J., Hamaguchi M. and Hanafusa H. (1988b). "A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C." *Nature* 332(6161): 272-275.
- Mayer B.J. and Hanafusa H. (1990). "Association of the *v-crak* oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7): 2638-2642.
- McDaniel T.K., Jarvis K.G., Donnenberg M.S. and Kaper J.B. (1995). "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1664-1668.
- McDaniel T.K. and Kaper J.B. (1997). "A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12." *Mol Microbiol* 23(2): 399-407.

- Mertins P., Eberl H.C., Renkawitz J., Olsen J.V., Tremblay M.L., Mann M., Ullrich A. and Daub H. (2008). "Investigation of protein-tyrosine phosphatase 1B function by quantitative proteomics." *Mol Cell Proteomics* 7(9): 1763-1777.
- Miki H., Miura K. and Takenawa T. (1996). "N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases." *EMBO J* 15(19): 5326-5335.
- Muralidharan V., Dutta K., Cho J., Vila-Perello M., Raleigh D.P., Cowburn D. and Muir T.W. (2006). "Solution structure and folding characteristics of the C-terminal SH3 domain of c-Crk-II." *Biochemistry* 45(29): 8874-8884.
- Nieto-Pelegrín E. (2013). "Role of cortactin and the adaptor proteins nck and crk in pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)." UCM-Tesis doctoral.
- Nieto-Pelegrin E. and Martinez-Quiles N. (2009). "Distinct phosphorylation requirements regulate cortactin activation by TirEPEC and its binding to N-WASP." *Cell Commun Signal* 7: 11.
- Ohoka Y. and Takai Y. (1998). "Isolation and characterization of cortactin isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90." *Genes Cells* 3(9): 603-612.
- Okamura H. and Resh M.D. (1995). "p80/85 cortactin associates with the Src SH2 domain and colocalizes with v-Src in transformed cells." *J Biol Chem* 270(44): 26613-26618.
- Ota S., Kizaka-Kondoh S., Hashimoto Y., Nishihara H., Nagashima K., Kurata T., Okayama H. and Matsuda M. (1998). "Constitutive association of EGF receptor with the CrkII-23 mutant that inhibits transformation of NRK cells by EGF and TGF-beta." *Cell Signal* 10(4): 283-290.
- Park T.J., Boyd K. and Curran T. (2006). "Cardiovascular and craniofacial defects in Crk-null mice." *Mol Cell Biol* 26(16): 6272-6282.
- Park T.J. and Curran T. (2013). "Essential roles of Crk and CrkL in fibroblast structure and motility." *Oncogene*.
- Parsons J.T., Horwitz A.R. and Schwartz M.A. (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9): 633-643.
- Perrin B.J., Amann K.J. and Huttenlocher A. (2006). "Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration." *Mol Biol Cell* 17(1): 239-250.
- Phillips A.D., Navabpour S., Hicks S., Dougan G., Wallis T. and Frankel G. (2000). "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine." *Gut* 47(3): 377-381.
- Phillips N., Hayward R.D. and Koronakis V. (2004). "Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation." *Nat Cell Biol* 6(7): 618-625.
- Polte T.R. and Hanks S.K. (1995). "Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23): 10678-10682.
- Pollard T.D. and Cooper J.A. (2009). "Actin, a central player in cell shape and movement." *Science* 326(5957): 1208-1212.

- Prosser S., Sorokina E., Pratt P. and Sorokin A. (2003). "CrkIII: a novel and biologically distinct member of the Crk family of adaptor proteins." *Oncogene* 22(31): 4799-4806.
- Reichman C., Singh K., Liu Y., Singh S., Li H., Fajardo J.E., Fiser A. and Birge R.B. (2005). "Transactivation of Abl by the Crk II adapter protein requires a PNAY sequence in the Crk C-terminal SH3 domain." *Oncogene* 24(55): 8187-8199.
- Reichman C.T., Mayer B.J., Keshav S. and Hanafusa H. (1992). "The product of the cellular *crk* gene consists primarily of SH2 and SH3 regions." *Cell Growth Differ* 3(7): 451-460.
- Ren G., Crampton M.S. and Yap A.S. (2009). "Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions." *Cell Motil Cytoskeleton* 66(10): 865-873.
- Ren R., Ye Z.S. and Baltimore D. (1994). "Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites." *Genes Dev* 8(7): 783-795.
- Ritchie J.M., Thorpe C.M., Rogers A.B. and Waldor M.K. (2003). "Critical roles for *stx2*, *eae*, and *tir* in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits." *Infect Immun* 71(12): 7129-7139.
- Rodrigo J.P., Garcia-Pedrero J.M., Suarez C., Takes R.P., Thompson L.D., Slootweg P.J., Woolgar J.A., Westra W.H., Brakenhoff R.H., Rinaldo A., Devaney K.O., Williams M.D., Gnepp D.R. and Ferlito A. (2012). "Biomarkers predicting malignant progression of laryngeal epithelial precursor lesions: a systematic review." *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269(4): 1073-1083.
- Rohatgi R., Ho H.Y. and Kirschner M.W. (2000). "Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate." *J Cell Biol* 150(6): 1299-1310.
- Rohatgi R., Nollau P., Ho H.Y., Kirschner M.W. and Mayer B.J. (2001). "Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway." *J Biol Chem* 276(28): 26448-26452.
- Rosales E.M., Aguilera M.O., Salinas R.P., Carminati S.A., Colombo M.I., Martinez-Quiles N. and Beron W. (2012). "Cortactin is involved in the entry of *Coxiella burnetii* into non-phagocytic cells." *PLoS One* 7(6): e39348.
- Rosen M.K., Yamazaki T., Gish G.D., Kay C.M., Pawson T. and Kay L.E. (1995). "Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein." *Nature* 374(6521): 477-479.
- Roxas J.L., Koutsouris A. and Viswanathan V.K. (2007). "Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced epidermal growth factor receptor activation contributes to physiological alterations in intestinal epithelial cells." *Infect Immun* 75(5): 2316-2324.
- Sabe H., Shoelson S.E. and Hanafusa H. (1995). "Possible v-Crk-induced transformation through activation of Src kinases." *J Biol Chem* 270(52): 31219-31224.
- Sadoul K., Wang J., Diagouraga B. and Khochbin S. (2011). "The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm." *J Biomed Biotechnol* 2011: 970382.
- Sangrar W., Gao Y., Scott M., Truesdell P. and Greer P.A. (2007). "Fer-mediated cortactin phosphorylation is associated with efficient fibroblast migration and is dependent on reactive oxygen species generation during integrin-mediated cell adhesion." *Mol Cell Biol* 27(17): 6140-6152.

- Sarkar P., Reichman C., Saleh T., Birge R.B. and Kalodimos C.G. (2007). "Proline cis-trans isomerization controls autoinhibition of a signaling protein." *Mol Cell* 25(3): 413-426.
- Sarkar P., Saleh T., Tzeng S.R., Birge R.B. and Kalodimos C.G. (2011). "Structural basis for regulation of the Crk signaling protein by a proline switch." *Nat Chem Biol* 7(1): 51-57.
- Schaller M.D. (2010). "Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions." *J Cell Sci* 123(Pt 7): 1007-1013.
- Schaller M.D., Hildebrand J.D., Shannon J.D., Fox J.W., Vines R.R. and Parsons J.T. (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." *Mol Cell Biol* 14(3): 1680-1688.
- Schaller M.D. and Parsons J.T. (1995). "pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk." *Mol Cell Biol* 15(5): 2635-2645.
- Schmidt M.A. (2010). "LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC." *Cell Microbiol* 12(11): 1544-1552.
- Schuuring E., Verhoeven E., Litvinov S. and Michalides R.J. (1993). "The product of the *EMS1* gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites." *Mol Cell Biol* 13(5): 2891-2898.
- Schuuring E., Verhoeven E., Mooi W.J. and Michalides R.J. (1992). "Identification and cloning of two overexpressed genes, *U21B31/PRAD1* and *EMS1*, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas." *Oncogene* 7(2): 355-361.
- Seidel-Dugan C., Meyer B.E., Thomas S.M. and Brugge J.S. (1992). "Effects of SH2 and SH3 deletions on the functional activities of wild-type and transforming variants of c-Src." *Mol Cell Biol* 12(4): 1835-1845.
- Selbach M. and Backert S. (2005). "Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens." *Trends Microbiol* 13(4): 181-189.
- Selbach M., Moese S., Hurwitz R., Hauck C.R., Meyer T.F. and Backert S. (2003). "The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation." *EMBO J* 22(3): 515-528.
- Senechal K., Halpern J. and Sawyers C.L. (1996). "The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the *BCR-ABL* oncogene." *J Biol Chem* 271(38): 23255-23261.
- Shalloway D., Zelenetz A.D. and Cooper G.M. (1981). "Molecular cloning and characterization of the chicken gene homologous to the transforming gene of Rous sarcoma virus." *Cell* 24(2): 531-541.
- Sharma A., Antoku S., Fujiwara K. and Mayer B.J. (2003). "Functional interaction trap: a strategy for validating the functional consequences of tyrosine phosphorylation of specific substrates in vivo." *Mol Cell Proteomics* 2(11): 1217-1224.
- Sharma A. and Mayer B.J. (2008). "Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling." *BMC Cell Biol* 9: 50.

- Shattil S.J., Kim C. and Ginsberg M.H. (2010). "The final steps of integrin activation: the end game." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4): 288-300.
- Shvetsov A., Berkane E., Chereau D., Dominguez R. and Reisler E. (2009). "The actin-binding domain of cortactin is dynamic and unstructured and affects lateral and longitudinal contacts in F-actin." *Cell Motil Cytoskeleton* 66(2): 90-98.
- Sieg D.J., Hauck C.R., Ilic D., Klingbeil C.K., Schaefer E., Damsky C.H. and Schlaepfer D.D. (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." *Nat Cell Biol* 2(5): 249-256.
- Smart J.E., Oppermann H., Czernilofsky A.P., Purchio A.F., Erikson R.L. and Bishop J.M. (1981). "Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(10): 6013-6017.
- Snapper S.B., Takeshima F., Anton I., Liu C.H., Thomas S.M., Nguyen D., Dudley D., Fraser H., Purich D., Lopez-Illasaca M., Klein C., Davidson L., Bronson R., Mulligan R.C., Southwick F., Geha R., Goldberg M.B., Rosen F.S., Hartwig J.H. and Alt F.W. (2001). "N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility." *Nat Cell Biol* 3(10): 897-904.
- Songyang Z., Shoelson S.E., Chaudhuri M., Gish G., Pawson T., Haser W.G., King F., Roberts T., Ratnofsky S., Lechleider R.J. and *et al.* (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." *Cell* 72(5): 767-778.
- Sriram G. and Birge R.B. (2010). "Emerging roles for crk in human cancer." *Genes Cancer* 1(11): 1132-1139.
- Sriram G. and Birge R.B. (2012). "Commentary: The carboxyl-terminal Crk SH3 domain: Regulatory strategies and new perspectives." *FEBS Lett* 586(17): 2615-2618.
- Sriram G., Reichman C., Tunceroglu A., Kaushal N., Saleh T., Machida K., Mayer B., Ge Q., Li J., Hornbeck P., Kalodimos C.G. and Birge R.B. (2011). "Phosphorylation of Crk on tyrosine 251 in the RT loop of the SH3C domain promotes Abl kinase transactivation." *Oncogene* 30(46): 4645-4655.
- Stevenson R.P., Veltman D. and Machesky L.M. (2012). "Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance." *J Cell Sci* 125(Pt 5): 1073-1079.
- Stuible M., Dube N. and Tremblay M.L. (2008). "PTP1B regulates cortactin tyrosine phosphorylation by targeting Tyr446." *J Biol Chem* 283(23): 15740-15746.
- Sun H., Shen Y., Dokainish H., Holgado-Madruga M., Wong A. and Ireton K. (2005). "Host adaptor proteins Gab1 and CrkII promote InlB-dependent entry of *Listeria monocytogenes*." *Cell Microbiol* 7(3): 443-457.
- Sun J. and Barbieri J.T. (2003). "*Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins." *J Biol Chem* 278(35): 32794-32800.
- Swimm A., Bommarius B., Li Y., Cheng D., Reeves P., Sherman M., Veach D., Bornmann W. and Kalman D. (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals." *Mol Biol Cell* 15(8): 3520-3529.

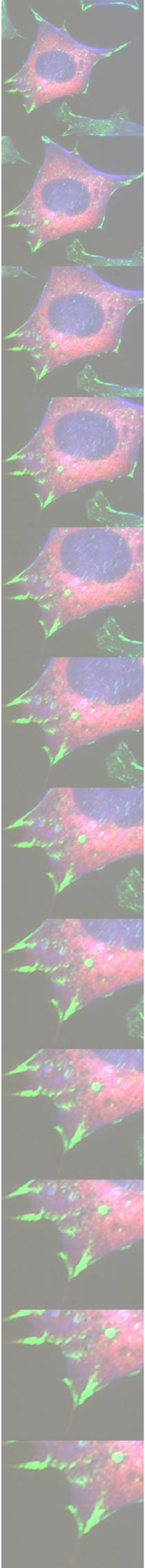
- Tadokoro S., Shattil S.J., Eto K., Tai V., Liddington R.C., de Pereda J.M., Ginsberg M.H. and Calderwood D.A. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." *Science* 302(5642): 103-106.
- Takeya T. and Hanafusa H. (1983). "Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV *src* gene and the mechanism for generating the transforming virus." *Cell* 32(3): 881-890.
- Tamkun J.W., DeSimone D.W., Fonda D., Patel R.S., Buck C., Horwitz A.F. and Hynes R.O. (1986). "Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin." *Cell* 46(2): 271-282.
- Tegtmeyer N., Wittelsberger R., Hartig R., Wessler S., Martinez-Quiles N. and Backert S. (2011). "Serine phosphorylation of cortactin controls focal adhesion kinase activity and cell scattering induced by *Helicobacter pylori*." *Cell Host Microbe* 9(6): 520-531.
- Tehrani S., Faccio R., Chandrasekar I., Ross F.P. and Cooper J.A. (2006). "Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly." *Mol Biol Cell* 17(7): 2882-2895.
- Tehrani S., Tomasevic N., Weed S., Sakowicz R. and Cooper J.A. (2007). "Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29): 11933-11938.
- ten Hoeve J., Kaartinen V., Fioretos T., Haataja L., Voncken J.W., Heisterkamp N. and Groffen J. (1994). "Cellular interactions of CRKL, and SH2-SH3 adaptor protein." *Cancer Res* 54(10): 2563-2567.
- ten Hoeve J., Morris C., Heisterkamp N. and Groffen J. (1993). "Isolation and chromosomal localization of *CRKL*, a human crk-like gene." *Oncogene* 8(9): 2469-2474.
- Tenney J.R., Hopkin R.J. and Schapiro M.B. (2011). "Deletion of 14-3-3 ϵ and CRK: a clinical syndrome with macrocephaly, developmental delay, and generalized epilepsy." *J Child Neurol* 26(2): 223-227.
- Tobe T., Beatson S.A., Taniguchi H., Abe H., Bailey C.M., Fivian A., Younis R., Matthews S., Marches O., Frankel G., Hayashi T. and Pallen M.J. (2006). "An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40): 14941-14946.
- Tomar A., Lawson C., Ghassemian M. and Schlaepfer D.D. (2012). "Cortactin as a target for FAK in the regulation of focal adhesion dynamics." *PLoS One* 7(8): e44041.
- Touze T., Hayward R.D., Eswaran J., Leong J.M. and Koronakis V. (2004). "Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor." *Mol Microbiol* 51(1): 73-87.
- Tsunoda K., Oikawa H., Tada H., Tatemichi Y., Muraoka S., Miura S., Shibazaki M., Maeda F., Takahashi K., Akasaka T., Masuda T. and Maesawa C. (2011). "Nucleus accumbens-associated 1 contributes to cortactin deacetylation and augments the migration of melanoma cells." *J Invest Dermatol* 131(8): 1710-1719.
- Uruno T., Liu J., Zhang P., Fan Y., Egile C., Li R., Mueller S.C. and Zhan X. (2001). "Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin." *Nat Cell Biol* 3(3): 259-266.

- Uruno T., Zhang P., Liu J., Hao J.J. and Zhan X. (2003). "Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) promotes actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization." *Biochem J* 371(Pt 2): 485-493.
- van Damme H., Brok H., Schuuring-Scholtes E. and Schuuring E. (1997). "The redistribution of cortactin into cell-matrix contact sites in human carcinoma cells with 11q13 amplification is associated with both overexpression and post-translational modification." *J Biol Chem* 272(11): 7374-7380.
- van Rossum A.G., de Graaf J.H., Schuuring-Scholtes E., Kluin P.M., Fan Y.X., Zhan X., Moolenaar W.H. and Schuuring E. (2003). "Alternative splicing of the actin binding domain of human cortactin affects cell migration." *J Biol Chem* 278(46): 45672-45679.
- van Rossum A.G., Moolenaar W.H. and Schuuring E. (2006). "Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading." *Exp Cell Res* 312(9): 1658-1670.
- Vuori K. and Ruoslahti E. (1995). "Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix." *J Biol Chem* 270(38): 22259-22262.
- Wang E. and Goldman R.D. (1978). "Functions of cytoplasmic fibers in intracellular movements in BHK-21 cells." *J Cell Biol* 79(3): 708-726.
- Wang P., Ballestrem C. and Streuli C.H. (2011). "The C terminus of talin links integrins to cell cycle progression." *J Cell Biol* 195(3): 499-513.
- Wang W., Chen L., Ding Y., Jin J. and Liao K. (2008). "Centrosome separation driven by actin-microfilaments during mitosis is mediated by centrosome-associated tyrosine-phosphorylated cortactin." *J Cell Sci* 121(Pt 8): 1334-1343.
- Wang W., Liu Y. and Liao K. (2011). "Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility." *BMC Cell Biol* 12: 49.
- Warawa J. and Kenny B. (2001). "Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation." *Mol Microbiol* 42(5): 1269-1280.
- Weaver A.M., Heuser J.E., Karginov A.V., Lee W.L., Parsons J.T. and Cooper J.A. (2002). "Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex." *Curr Biol* 12(15): 1270-1278.
- Weaver A.M., Karginov A.V., Kinley A.W., Weed S.A., Li Y., Parsons J.T. and Cooper J.A. (2001). "Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation." *Curr Biol* 11(5): 370-374.
- Webb B.A., Zhou S., Eves R., Shen L., Jia L. and Mak A.S. (2006). "Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase." *Arch Biochem Biophys* 456(2): 183-193.
- Weed S.A., Karginov A.V., Schafer D.A., Weaver A.M., Kinley A.W., Cooper J.A. and Parsons J.T. (2000). "Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex." *J Cell Biol* 151(1): 29-40.
- Weed S.A. and Parsons J.T. (2001). "Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly." *Oncogene* 20(44): 6418-6434.

- Weiss S.R., Varmus H.E. and Bishop J.M. (1977). "The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcoma-leukosis viruses." *Cell* 12(4): 983-992.
- Welch M.D. and Way M. (2013). "Arp2/3-mediated actin-based motility: a tail of pathogen abuse." *Cell Host Microbe* 14(3): 242-255.
- Weng Z., Taylor J.A., Turner C.E., Brugge J.S. and Seidel-Dugan C. (1993). "Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells." *J Biol Chem* 268(20): 14956-14963.
- Wong A.R., Pearson J.S., Bright M.D., Munera D., Robinson K.S., Lee S.F., Frankel G. and Hartland E.L. (2011). "Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements." *Mol Microbiol* 80(6): 1420-1438.
- Wu H. and Parsons J.T. (1993). "Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex." *J Cell Biol* 120(6): 1417-1426.
- Wu H., Reynolds A.B., Kanner S.B., Vines R.R. and Parsons J.T. (1991). "Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate." *Mol Cell Biol* 11(10): 5113-5124.
- Wu X., Suetsugu S., Cooper L.A., Takenawa T. and Guan J.L. (2004). "Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function." *J Biol Chem* 279(10): 9565-9576.
- Xu W., Harrison S.C. and Eck M.J. (1997). "Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src." *Nature* 385(6617): 595-602.
- Yadav S.S., Yeh B.J., Craddock B.P., Lim W.A. and Miller W.T. (2009). "Reengineering the signaling properties of a Src family kinase." *Biochemistry* 48(46): 10956-10962.
- Yang X.J. and Gregoire S. (2007). "Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nepsilon - and O-acetylation." *EMBO Rep* 8(6): 556-562.
- Yang X.J. and Seto E. (2008). "Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications." *Mol Cell* 31(4): 449-461.
- Yeo M.G., Partridge M.A., Ezratty E.J., Shen Q., Gundersen G.G. and Marcantonio E.E. (2006). "Src SH2 arginine 175 is required for cell motility: specific focal adhesion kinase targeting and focal adhesion assembly function." *Mol Cell Biol* 26(12): 4399-4409.
- Yoshida M., Kijima M., Akita M. and Beppu T. (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A." *J Biol Chem* 265(28): 17174-17179.
- Yu H., Chen J.K., Feng S., Dalgarno D.C., Brauer A.W. and Schreiber S.L. (1994). "Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains." *Cell* 76(5): 933-945.
- Zhan X., Hu X., Hampton B., Burgess W.H., Friesel R. and Maciag T. (1993). "Murine cortactin is phosphorylated in response to fibroblast growth factor-1 on tyrosine residues late in the G1 phase of the BALB/c 3T3 cell cycle." *J Biol Chem* 268(32): 24427-24431.
- Zhang X., Jiang G., Cai Y., Monkley S.J., Critchley D.R. and Sheetz M.P. (2008). "Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction." *Nat Cell Biol* 10(9): 1062-1068.

- Zhang X., Shrikhande U., Alicie B.M., Zhou Q. and Geahlen R.L. (2009). "Role of the protein tyrosine kinase Syk in regulating cell-cell adhesion and motility in breast cancer cells." *Mol Cancer Res* 7(5): 634-644.
- Zhang X., Yuan Z., Zhang Y., Yong S., Salas-Burgos A., Koomen J., Olashaw N., Parsons J.T., Yang X.J., Dent S.R., Yao T.P., Lane W.S. and Seto E. (2007). "HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin." *Mol Cell* 27(2): 197-213.
- Zhang Y., Zhang M., Dong H., Yong S., Li X., Olashaw N., Kruk P.A., Cheng J.Q., Bai W., Chen J., Nicosia S.V. and Zhang X. (2009). "Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration." *Oncogene* 28(3): 445-460.
- Zhao J., Wei J., Mialki R., Zou C., Mallampalli R.K. and Zhao Y. (2012). "Extracellular signal-regulated kinase (ERK) regulates cortactin ubiquitination and degradation in lung epithelial cells." *J Biol Chem* 287(23): 19105-19114.
- Zhao X. and Guan J.L. (2011). "Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis." *Adv Drug Deliv Rev* 63(8): 610-615.

APÉNDICE



Cortactin, an oncoprotein targeted by pathogens during infection

E. Nieto-Pelegrín¹, E. Meiler¹, and N. Martínez-Quiles^{1,2}

¹ Department of Microbiology, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avda de la Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

² Corresponding author: narcisaquiles@farm.ucm.es

1. Introduction

Cell motility and locomotion are important for many cellular functions. The cell skeleton or cytoskeleton remodels itself during multiple cellular tasks. For example, the actin cortical cytoskeleton undergoes significant changes during endocytosis, cell migration, adhesion and bacterial invasion [1].

The cytoskeleton is made up of actin, intermediate and tubulin filaments. There is crosstalk among these constituents, allowing then to behave as a complex network. We are just beginning to understand some of the aspects of this network and to flesh out the broad strokes of how it is regulated. We are confronted by great biological complexity, so we must try to simplify it in order to understand it. Thus, it would contribute to our knowledge of the cytoskeleton as a whole if we focus on some details of a particular protein that helps to orchestrate some of these changes. This review focuses on cortactin, a protein that has emerged as an important convergence node in the regulation of the cytoskeleton during numerous biological tasks. More than to give an exhaustive review, our intention is to give a general vision of the best known aspects of this protein, while highlighting with a personal view some more controversial aspects that may require further studies. We recommend some recent reviews of cortactin that complement the present one [2,3].

2. From the first studies of cortactin to the present

Cortactin was originally described as a protein located at the cell cortex and as a substrate of the Src kinase [4]. At nearly the same time, it was identified as the product of the CTTN gene (formerly EMS1), located in a chromosomal region, 11q13, frequently amplified in different human carcinomas [5]. Today, cortactin is considered an oncoprotein and a *bona fide* invadopodia marker. Invadopodia are actin-rich protrusions of the cell membrane that penetrate the extracellular matrix and degrade it, mainly through the accumulation and action of metalloproteinases [6,7]. At the same time, cortactin is a preferential target for bacterial and viral pathogens that subvert the cytoskeleton to their own benefit. For this reason, it has been called ‘the Achilles’ heel of the actin cytoskeleton’ [8].

3. Cortactin is an important node in the regulation of the actin cellular network

Cortactin is a modular protein that participates in many signals that converge on the alteration of the actin cytoskeleton. Actin polymerization occurs when the globular monomeric form (G-actin) ensembles into a filamentous form (F-actin). The initial formation of a dimeric or a trimeric nucleus is unstable, and it is promoted and controlled by proteins that facilitate the process. One such protein is the Arp2/3 complex, which comprises two subunits, called actin-related proteins 2 and 3, as well as five other subunits. This complex is able to add a ‘branch’ to the side of a preexisting filament, giving rise to branched filaments with a characteristic 70-degree angle [1].

Cortactin has an N-terminal acidic motif (NTA) that directly binds and activates the Arp2/3 complex, thereby behaving as a nucleation-promoting factor (NPF). The NTA domain is followed by a six and a half repeats of amino acids that bind to F-actin, binding that is required for cortactin activity [3]. However cortactin is a weak activator of the Arp2/3 complex *in vitro*, which raises the question of whether wild-type (WT) cortactin is active or whether it requires some post-translational modification to be fully active. Indeed, although cortactin has a predicted molecular weight of approximately 65 kDa, it migrates as an 80/85 kDa doublet in SDS-PAGE. To add to the complexity, cortactin is expressed as several isoforms that differ in the number of repeats, which seems to be related to the location of these isoforms to cell-cell contacts in epithelial cells [9]. In particular, a detailed analysis of cortactin expression is needed for immunological cells, since in most situations it is assumed that a paralog protein HS1 plays the role of cortactin. We favor the hypothesis that the pattern of expression of cortactin is similar to that of N-WASP/WASP (see next paragraph). Clearly, we do not understand some basic aspects of cortactin expression and post-translational modification.

There is another way in which cortactin can promote actin nucleation: its SH3 terminal domain binds directly and activates the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) [10, 11]. The first described activators of the Arp2/3 complex were the WASP family of proteins. The representative member of the family, WASP, which is expressed exclusively in the immune system, is mutated in the immune deficiency called Wiskott-Aldrich syndrome (WAS). N-

Cortactin Tyrosine Phosphorylation Promotes Its Deacetylation and Inhibits Cell Spreading

Eugenia Meiler, Elvira Nieto-Pelegrín, Narcisa Martínez-Quiles*

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Background: Cortactin is a classical Src kinase substrate that participates in actin cytoskeletal dynamics by activating the Arp2/3 complex and interacting with other regulatory proteins, including FAK. Cortactin has various domains that may contribute to the assembly of different protein platforms to achieve process specificity. Though the protein is known to be regulated by post-translational modifications such as phosphorylation and acetylation, how tyrosine phosphorylation regulates cortactin activity is poorly understood. Since the basal level of tyrosine phosphorylation is low, this question must be studied using stimulated cell cultures, which are physiologically relevant but unreliable and difficult to work with. In fact, their unreliability may be the cause of some contradictory findings about the dynamics of tyrosine phosphorylation of cortactin in different processes.

Methodology/Principal Findings: In the present study, we try to overcome these problems by using a Functional Interaction Trap (FIT) system, which involves cotransfecting cells with a kinase (Src) and a target protein (cortactin), both of which are fused to complementary leucine-zipper domains. The FIT system allowed us to control precisely the tyrosine phosphorylation of cortactin and explore its relationship with cortactin acetylation.

Conclusions/Significance: Using this system, we provide definitive evidence that a competition exists between acetylation and tyrosine phosphorylation of cortactin and that phosphorylation inhibits cell spreading. We confirmed the results from the FIT system by examining endogenous cortactin in different cell types. Furthermore, we demonstrate that cell spreading promotes the association of cortactin and FAK and that tyrosine phosphorylation of cortactin disrupts this interaction, which may explain how it inhibits cell spreading.

Citation: Meiler E, Nieto-Pelegrín E, Martínez-Quiles N (2012) Cortactin Tyrosine Phosphorylation Promotes Its Deacetylation and Inhibits Cell Spreading. PLoS ONE 7(3): e33662. doi:10.1371/journal.pone.0033662

Editor: Laszlo Buday, Hungarian Academy of Sciences, Hungary

Received: January 4, 2012; **Accepted:** February 14, 2012; **Published:** March 30, 2012

Copyright: © 2012 Meiler et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by an Instituto de Salud Carlos III grant (PS09/0080) and a Fundación Médica Mutua Madrileña Personnel grant (01754/2008) to NMQ. NMQ is also funded by the I3 program [Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)]. EMR and ENP are predoctoral fellows supported, respectively, by the Formación Personal Universitario (FPU) program of MICINN and by the Universidad Complutense de Madrid (UCM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: narcisaquiles@farm.ucm.es

Introduction

The actin cytoskeleton remodels to accomplish many cellular processes and therefore undergoes significant changes during cell migration, adhesion, endocytosis and bacterial invasion [1]. The cortactin protein has emerged as an important node in the network regulating the actin cytoskeleton during numerous biological processes [2,3]. It was originally described as a substrate of Src kinase located primarily at the cell cortex [4]. Almost simultaneously, cortactin was cloned as the product of the *CTTN* gene (formerly *EMSI*), located in chromosomal region 11q13, which is frequently amplified in different human carcinomas [5]. Today, cortactin is considered an oncoprotein and a *bona fide* invadopodial marker [6].

Cortactin is a modular protein that contains an N-terminal acidic (NTA) domain with a $_{20}DDW_{22}$ motif that directly binds and activates the Arp2/3 complex. The NTA domain is followed by six and a half amino acid 'repeats' that bind to F-actin and define the actin-binding region (ABR) [7]. Since cortactin only weakly activates the Arp2/3 complex *in vitro* [8], it is unclear

whether cortactin requires post-translational modifications to be fully active. The ABR is followed by a helical, proline-rich region, followed in turn by a C-terminal Src homology (SH3) domain. Cortactin binds several proteins through its SH3 domain, such as WIP [9] and neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) [10,11].

Cortactin regulation is very complex [12]. Although traditionally studied as a substrate of Src family kinases (SFKs) [4], it can also be phosphorylated by other tyrosine kinases such as Fer [13] and Abl/Arg [14]. The effects of tyrosine phosphorylation on cortactin structure and function remain largely unknown. This phosphorylation was shown to decrease cortactin binding to F-actin [15], and this binding is required for cortactin activation of the Arp2/3 complex [16]. This phosphorylation is also required for inducing bone metastasis of breast cancer cells in nude mice [17], and it appears to be involved in bacterial invasion of cells, such as for the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) [18]. Protein phosphatase 1B (PTB-1B) dephosphorylates tyrosine 421 in cortactin [19], suggesting reversible regulation. The data seem to indicate that tyrosine phosphorylation of cortactin is

Crk Adaptors Negatively Regulate Actin Polymerization in Pedestals Formed by Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) by Binding to Tir Effector

Elvira Nieto-Pelegrin^{1*}, Eugenia Meiler^{2*}, José Manuel Martín-Villa², María Benito-León², Narcisa Martínez-Quiles^{1,2*}

¹ Department of Microbiology, School of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain, ² Division of Immunology, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

Abstract

Infections by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) cause diarrhea linked to high infant mortality in developing countries. EPEC adheres to epithelial cells and induces the formation of actin pedestals. Actin polymerization is driven fundamentally through signaling mediated by Tir bacterial effector protein, which inserts in the plasma membrane of the infected cell. Tir binds Nck adaptor proteins, which in turn recruit and activate N-WASP, a ubiquitous member of the Wiskott-Aldrich syndrome family of proteins. N-WASP activates the Arp2/3 complex to promote actin polymerization. Other proteins aside from components of the Tir-Nck-N-WASP pathway are recruited to the pedestals but their functions are unknown. Here we investigate the function of two alternatively spliced isoforms of Crk adaptors (CrkI/II) and the paralog protein CrkL during pedestal formation by EPEC. We found that the Crk isoforms act as redundant inhibitors of pedestal formation. The SH2 domain of CrkII and CrkL binds to phosphorylated tyrosine 474 of Tir and competes with Nck to bind Tir, preventing its recruitment to pedestals and thereby inhibiting actin polymerization. EPEC infection induces phosphorylation of the major regulatory tyrosine in CrkII and CrkL, possibly preventing the SH2 domain of these proteins from interacting with Tir. Phosphorylated CrkII and CrkL proteins localize specifically to the plasma membrane in contact with EPEC. Our study uncovers a novel role for Crk adaptors at pedestals, opening a new perspective in how these oncoproteins regulate actin polymerization.

Citation: Nieto-Pelegrin E, Meiler E, Martín-Villa JM, Benito-León M, Martínez-Quiles N (2014) Crk Adaptors Negatively Regulate Actin Polymerization in Pedestals Formed by Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) by Binding to Tir Effector. PLoS Pathog 10(3): e1004022. doi:10.1371/journal.ppat.1004022

Editor: Guy Tran Van Nhieu, Collège de France, France

Received: July 30, 2013; **Accepted:** February 5, 2014; **Published:** March 27, 2014

Copyright: © 2014 Nieto-Pelegrin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III to NMQ (P509/0080) and from 2013, to JMMV (PI12/01663). NMQ is cofunded by the I3 program of the former Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN). ENP and EM were supported by a grant to NMQ from Fundación Médica Mutua Madrileña (01754/2008), and by Complutense University and Ministerio de Educación (FPU AP2009-1529) fellowships, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: narcisa-quiles@med.ucm.es

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) causes infant diarrhea worldwide and is a leading cause of death in developing countries. EPEC adheres to intestinal epithelial cells, causing local disappearance of microvilli and altering cell permeability, giving rise to what are classically known as attaching and effacing (A/E) lesions [1]. At A/E lesions, EPEC attaches to host cells and induces the formation of actin-rich structures called pedestals. Although the ultimate function of pedestals is not completely understood, disrupting genes critical for pedestal formation diminishes colonization and subsequent disease in humans [2] and animal models [3]. Pedestals may facilitate EPEC growth and residence inside the intestine by allowing the bacteria to remain attached to the epithelium during peristalsis and host responses to infection [4].

EPEC uses a type III secretion system to deliver effectors into host cells. One such effector is the translocated intimin receptor, Tir, which drives the major pathway responsible for regulating actin polymerization. Upon injection into the cell cytoplasm, Tir

inserts in the plasma membrane, exposing a loop on the cell surface, which in turn binds another bacterial protein, the adhesin intimin [5]. This binding is accompanied by the clustering of Tir and by its phosphorylation on Tyr474 within the C-terminal cytoplasmic domain. This regulatory phosphotyrosine recruits the host cell adaptor protein non-catalytic tyrosine kinase Nck, which in turn recruits N-WASP [6]. Recruitment and activation of N-WASP [7] and of other actin-nucleating proteins such as cortactin [8,9] leads to Arp2/3 complex-mediated actin polymerization.

Pedestals act as a “molecular niche” to recruit not only actin machinery but many other proteins as well. These proteins include those normally localized to focal adhesions, such as vinculin and talin [10], cell cortex proteins such as ezrin [11] and adaptor proteins such as CT10 regulator of kinase (Crk) proteins [12]. Several excellent reviews have recently been written about EPEC signaling [13,14,15].

The first member of the Crk adaptor family to be discovered was v-Crk, a chicken tumor viral oncoprotein that increases tyrosine phosphorylation in cells [16]. The cellular counterpart of v-Crk is CrkII, a proto-oncoprotein that contains an N-terminal